

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Herve PERRON, Monique LAFONT Attn: PCT Branch

Application No. U.S. National Stage of PCT/FR00/00691

Filed: September 18, 2001 Docket No.: 110631

For: DETECTING SUPERANTIGEN ACTIVITY IN A BIOLOGICAL SAMPLE

TRANSLATION OF THE ANNEXES TO THE
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

Director of the U.S. Patent and Trademark Office
Washington, D.C. 20231

Sir:

Attached hereto is a translation of the annexes to the International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/409). The attached translated material replaces the material in the claims.

Respectfully submitted,

William P. Berridge
Registration No. 30,024

Melanie L. Mealy
Registration No. 40,085

WPB:MLM/cmm

Date: September 18, 2001

OLIFF & BERRIDGE, PLC
P.O. Box 19928
Alexandria, Virginia 22320
Telephone: (703) 836-6400

DEPOSIT ACCOUNT USE
AUTHORIZATION
Please grant any extension
necessary for entry;
Charge any fee due to our
Deposit Account No. 15-0461

This Page Blank (uspto)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR00/00691

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, Susan POTTS BA ACIS

Director to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare:

That the translator responsible for the attached translation is knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of RWS Group plc knowledge and belief, the English translation of the amended sheets of the international application No. PCT/FR00/00691 is a true and complete translation of the amended sheets of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: August 23, 2001

Signature of Director :



For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,

Gerrards Cross, Buckinghamshire,

England.

This Page Blank (uspto)

PCT**REQUEST**

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

International Application No. PCT/FR00/00691

09/936835

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) MD/B05B3352**Box No. I TITLE OF INVENTION**

DETECTING SUPERANTIGEN ACTIVITY IN A BIOLOGICAL SAMPLE

Box No. II APPLICANT This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BIO MERIEUX
Chemin de l'Orme
F-69280 MARCY L'ETOILE
France

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

France

State (that is, country) of residence:

France

This person is applicant all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

PERRON, Herve
15 rue de Boyer
F-69005 LYON
France

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

France

State (that is, country) of residence:

France

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

 Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

 agent common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
F-69466 LYON CEDEX 06
FRANCE

Telephone No.
04 72 69 84 30Facsimile No.
04 72 69 84 31

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

 Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

This Page Blank (uspto)

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LAFONT, Monique
2 Hameau d'Alleray
F-75015 PARIS
FRANCE

This person is:

- applicant only
- applicant and inventor
- inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

France

State (that is, country) of residence:

France

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- applicant only
- applicant and inventor
- inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- applicant only
- applicant and inventor
- inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- applicant only
- applicant and inventor
- inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

This Page Blank (uspto)

Box No. V DESIGNATION OF STATES*Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.*The following designations are hereby made under Rule 4.9(a): (**Double-click here if you want all the boxes below checked.**)**Regional Patent**

AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT

EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (*if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line*).....

National Patent (*if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line*):

<input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates	<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi
<input type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda	<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico
<input checked="" type="checkbox"/> AL Albania	<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia	<input checked="" type="checkbox"/> MZ Mozambique
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia	<input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norway
<input checked="" type="checkbox"/> AT Austria	<input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia	<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia	<input checked="" type="checkbox"/> PL Poland
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan	<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina	<input checked="" type="checkbox"/> IN India	<input checked="" type="checkbox"/> RO Romania
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria	<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil	<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya	<input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore
<input type="checkbox"/> BZ Belize	<input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia
<input checked="" type="checkbox"/> CH & LI Switzerland and Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan
<input type="checkbox"/> CO Colombia	<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica	<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia	<input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey
<input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba	<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic	<input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania	<input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania
<input checked="" type="checkbox"/> DE Germany	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine
<input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark	<input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda
<input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica	<input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America
<input type="checkbox"/> DZ Algeria	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar	<input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spain	<input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia	<input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finland	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia	<input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa
<input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe	
<input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada		

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (*Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.*)

This Page Blank (uspto)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office
item (1) 19/03/1999	9903622	France		
item (2) 28/10/1999	9913755	France		
item (3)				
item (4)				
item (5)				

Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (*only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office*) identified above as:

all items item (1) item (2) item (3) item (4) item (5) other, see Supplemental Box

*Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (*if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used*):

ISA /EP.....

Request to use results of earlier search: reference to that search (*if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority*):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following **declarations** are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

		Number of declarations
<input type="checkbox"/>	Box No. VIII (i) Declaration as to the identify of the inventor	:
<input type="checkbox"/>	Box No. VIII (ii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
<input type="checkbox"/>	Box No. VIII (iii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
<input type="checkbox"/>	Box No. VIII (iv) Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
<input type="checkbox"/>	Box No. VIII (v) Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

This Page Blank (uspto)

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) the following number of sheets in paper form:

request (including declaration sheets)	: 4
description (excluding sequence listing part)	: 95
claims	: 20
abstract	: 1
drawings	: 5

Sub-total number of sheets :

125

sequence listing part of description (*actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below*) : 4

Total number of sheets : 129

(b) sequence listing part of description filed in computer readable form

- (i) only (under Section 801(a)(i))
- (ii) in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(ii))

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which the sequence listing part is contained (additional copies to be indicated under item 9(ii), in right column):

This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):

1. <input type="checkbox"/>	fee calculation sheet	:
2. <input type="checkbox"/>	original separate power of attorney	:
3. <input type="checkbox"/>	original general power of attorney	:
4. <input type="checkbox"/>	copy of general power of attorney; reference number, if any:.....	:
5. <input type="checkbox"/>	statement explaining lack of signature	:
6. <input type="checkbox"/>	priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):.....	:
7. <input type="checkbox"/>	translation of international application into (language):.....	:
8. <input type="checkbox"/>	separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:
9. <input type="checkbox"/>	sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))	:
(i) <input type="checkbox"/>	copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	:
(ii) <input type="checkbox"/>	(only where check-box (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:
(iii) <input type="checkbox"/>	together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column	:
10. <input type="checkbox"/>	other (specify)	:

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: French

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

CABINET GERMAIN & MAUREAU
DIDIER Mireille

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	<input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /EP	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

This Page Blank (uspto)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

8

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MD/B05B3352	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00691	International filing date (day/month/year) 20 March 2000 (20.03.00)	Priority date (day/month/year) 19 March 1999 (19.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/569		
Applicant BIO MERIEUX		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>25</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 October 2000 (04.10.00)	Date of completion of this report 25 June 2001 (25.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00691

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

the international application as originally filed
 the description:

pages _____ 1-95 _____, as originally filed
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

the claims:

pages _____ , as originally filed
 pages _____ , as amended (together with any statement under Article 19)
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ 1-77 _____, filed with the letter of 23 March 2001 (23.03.2001)

the drawings:

pages _____ 1/5-5/5 _____, as originally filed
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

the sequence listing part of the description:

pages _____ , as originally filed
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig. _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00691

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.
 claims Nos. _____ 72

because:

the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
 no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
 the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/FR 00/00691**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box III

The Examining Authority considers that the subject matter of Claim 72 is covered by the provisions of PCT Rule 67.1. For that reason, no opinion shall be given as to the industrial applicability of that claim (PCT Article 34(4)(a)(i)).

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/00691

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-71 & 73-77	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-71 & 73-77	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-71 & 73-77	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are referred to; these documents are cited in the international search report:

D1: H. Perron et al. (1998). Retrovirus, cytotoxic molecules including superantigen and multiple sclerosis: Epiphénoménon or new avenue of research.

Journal of Neuroimmunology, Vol. 90, N° 1, pp. 68.

Meeting Info.: Fifth International Congress of the International Society of Neuroimmunology, Montreal, Canada, August 23-27, 1998.

D2: B.A. Torres et al. (1996). HIV encodes for its own CD4 T-cell superantigen mitogen. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 225, N° 2, pp. 672-678.

Superantigens are molecules that are capable of binding to Class II molecules of the Major Histocompatibility Complex (MHC) and to characteristic peptide sequences of certain families of T-cell (Va) receptors. These superantigens activate a large number of T clones, irrespective of the antigenic peptide recognised by their TCR (T-cell receptor) in conjunction with the MHC of the cell displaying antigens. Superantigens are expression products of micro-organisms, such as bacteria and exogenic or endogenic retroviruses. The

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/FR 00/00691

applicant has now demonstrated that the expression of a superantigen or of a protein having certain superantigen-type effects is linked to a pathological condition, such as a condition associated with multiple sclerosis. The invention concerns, in particular, a method for detecting superantigenic activity in a biological sample, involving the revelation of a predominant gain in lymphocytes carrying a V beta 16 and/or V beta 17 determinant, or of a predominant loss of lymphocytes carrying a V beta 16 determinant, and a method for detecting a pathological condition in a biological sample, whereby at least one of the following parameters is revealed: superantigenic activity, stimulated production of cytokines such as IL-6 and INF-gamma, or induced apoptosis.

D1 (see abstract), which is considered to represent the closest prior art, describes a human retrovirus, particularly MSRV-1, which has superantigenic activity and which is associated with an autoimmune disease, notably multiple sclerosis. D1 does not suggest that the superantigenic activity is directly induced by an MSRV-1 protein.

D2 (see abstract), which is also considered to represent the closest prior art, describes a composition containing an agent, particularly an antibody, capable of preventing the interaction of the superantigen, particularly Nef, with the antigen-displaying cells. D2 does not describe a composition intended to inhibit superantigenic activity, which is indicated by a predominant gain or loss of lymphocytes carrying a V beta 16 and/or V beta 17 determinant.

D1 and D2 are considered to represent the general background art.

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/FR 00/00691

Consequently, Claims 1-71 and 73-77 of the present application are considered to be novel and inventive within the meaning of PCT Article 33(2) and (3); they are also considered to be industrially applicable.

This Page Blank (reverse)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/FR 00/00691**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), neither D1, nor D2, nor the relevant prior art disclosed in those documents is mentioned in the description.

This Page Blank (uspto)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 1, 2 and 3 are unclear and fail to meet the requirements of PCT Article 6, in so far as the subject matter for which protection is sought is not clearly defined: the expressions "a predominant loss" and "a predominant gain" would not be clear to a person skilled in the art.
2. Although Claims 41-44 have been drafted as separate independent claims, it appears that they have the same subject matter and that they differ only by virtue of a variation in the definition of the subject matter for which protection is sought and in the terms used to define its features. These claims are therefore not concise. Moreover, taken as a whole, the claims are unclear, because the plurality of independent claims makes it difficult if not impossible to determine the subject matter for which protection is sought, and undue effort is required for a third party to determine the desired scope of protection.

Consequently, Claims 41-44 do not meet the requirements of PCT Article 6.

3. Claims 53-71 are unclear and fail to meet the requirements of PCT Article 6, in so far as the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The following functional definition would not enable a person skilled in the art to determine the necessary technical features of the compositions of Claims 53-71: "a therapeutic agent... etc., as defined in Claims 1 to 6".

This Page Blank (uspto)

CLAIMS

1. A method for detecting superantigen activity in a biological sample, characterized in that a majority expansion of lymphocytes bearing a V β 16 and/or V β 17 determinant or a majority loss of lymphocytes bearing a V β 16 and/or V β 17 determinant is demonstrated.
5
2. The detection method as claimed in claim 1, characterized in that a majority expansion of lymphocytes bearing a V β 16 determinant is demonstrated.
10
3. The detection method as claimed in claim 1, characterized in that a majority loss of lymphocytes bearing a V β 16 determinant is demonstrated.
15
4. The method as claimed in claim 2, characterized in that a majority expansion of lymphocytes bearing a V β 16 determinant and a co-expansion of lymphocytes bearing V β s chosen from at least any one of V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, and preferably of V β 3 and V β 12, are demonstrated.
20
5. The method as claimed in claim 3, characterized in that a majority loss of lymphocytes bearing a V β 16 determinant and of a co-decrease of lymphocytes bearing V β s chosen from at least any one of V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, preferably at least any one of V β 7, V β 14 and V β 17, and advantageously of V β 7 and V β 17, are demonstrated.
25
6. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized in that the biological sample originates from a patient suffering from an autoimmune disease, in particular multiple sclerosis.
30
7. The method for detecting superantigen activity as claimed in any one of claims 1 to 6, characterized in that:
 - (i) a culture supernatant of blood mononucleated cells or of choroid plexus cells or of leptomeningeal cells, said cells originating from patients suffering from an autoimmune disease or
35

This Page Blank (uspto)

suspected of having a risk of developing the disease, in particular multiple sclerosis, or of an established cell line, such as the cells of the PLI-2 cell line deposited at the ECACC on July 22, 1992, under the 5 number 92072201 and the LM7PC cell line deposited at the ECACC on January 8, 1993, under the number 93010817, in accordance with the provisions of the Treaty of Budapest, is sampled, and

10 (ii) said culture supernatant, or a part of the culture supernatant is brought into contact with a series of cultures, preferably at least three, of blood mononucleated cells originating from healthy donors, and

15 (iii) said expansion and, optionally, a co-expansion, or said loss and, optionally, co-decrease of the blood mononucleated cells of step (ii) are detected.

8. The method as claimed in claim 7, characterized in that the blood mononucleated cells originating from 20 patients suffering from MS are chosen from monocytes and B lymphocytes and the blood mononucleated cells originating from healthy donors are chosen from T lymphocytes.

9. The method for detecting superantigen activity 25 as claimed in any one of claims 1 to 6, characterized in that:

(i) blood mononucleated cells are sampled, said cells originating from patients suffering from an autoimmune disease or from patients suspected of having 30 a risk of developing an autoimmune disease, in particular MS, and from healthy individuals,

(ii) said blood mononucleated cells originating from patients or from healthy individuals are brought into contact with culture supernatants, or a fraction 35 of culture supernatant, of cells chosen from blood mononucleated cells, choroid plexus cells and leptomeningeal cells, and cells derived from established cell lines, such as the cells of the PLI-2

This Page Blank (uspto)

cell line deposited at the ECACC on July 22, 1992,
under the number 92072201 and the LM7PC cell line
deposited at the ECACC on January 8, 1993, under the
number 93010817, in accordance with the provisions of
5 the Treaty of Budapest, and

(iii) said expansion and, optionally, co-expansion, or said loss and, optionally, co-decrease, using the blood mononucleated cells of step (i) are detected.

10 10. The method as claimed in claims 7, 8 and 9, characterized in that said expansion and, optionally, co-expansion is demonstrated using ligands, each ligand being specific for a determinant chosen from V β 16, V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, preferably
15 V β 16, V β 3 and V β 12, and in that said loss and, optionally co-decrease is demonstrated using ligands, each ligand being specific for a determinant chosen from V β 16, V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, preferably V β 16, V β 7, V β 14 and V β 17.

20 11. The method as claimed in claim 10, characterized in that the ligand is an antibody, preferably a monoclonal antibody or an antibody fragment.

25 12. The method as claimed in claim 7, 8 and 9, characterized in that in order to demonstrate said expansion and, optionally, co-expansion or said loss and, optionally, co-decrease, the following is carried out

30 (i) extraction of the total RNAs from the blood mononucleated cells which have been placed together with MS culture supernatant or a fraction of MS culture supernatant and together with control culture supernatant or a fraction of control culture supernatant,

35 (ii) reverse transcription of said RNAs,

(iii) amplification specific for each V β family using a given pair of primers,

This Page Blank (uspto)

(iv) labeling of the amplification products obtained, with any suitable label,

(v) electrophoresis of said amplification products and analysis of the electrophoretic profiles obtained, using a suitable detector.

5 13. The method as claimed in claim 12, characterized in that the blood mononucleated cells originating from patients suffering from MS are chosen from lymphocytes.

10 14. A method for detecting a pathological condition or a predisposition to a pathological condition, in a biological sample, characterized in that at least one of the following parameters is demonstrated:

15 superantigen activity, as defined in any one of claims 1 to 13,

stimulation of the production of cytokines, such as IL-6 and γ -INF,

induction of cellular apoptosis.

15. The method as claimed in claim 14, 20 characterized in that at least two of the parameters are detected in combination.

25 16. The method as claimed in claim 15, characterized in that superantigen activity and induction of apoptosis or superantigen activity and stimulation of the production of cytokines are detected.

17. The method as claimed in claim 14, characterized in that the three parameters are detected in combination.

30 18. The method as claimed in claim 7, 8 and 9, characterized in that the pathological condition is associated with an autoimmune disease, such as multiple sclerosis.

35 19. The method as claimed in any one of the preceding claims, characterized in that the superantigen activity is induced directly or indirectly by an effector agent chosen from proteins and/or microorganisms and/or pathogenic agents.

This Page Blank (uspto)

20. The method as claimed in claim 19, characterized in that the microorganism is chosen from bacteria and retroviruses, preferably human retroviruses, and in particular the retrovirus is
5 MSRV-1 and in particular the pathogenic agent is MSRV-2.

21. The method as claimed in claims 19 and 20, characterized in that the superantigen activity is induced by the envelope protein of MSRV-1 referenced in
10 SEQ ID No. 2 or by a fragment of said protein.

22. The method as claimed in claims 19 and 20, characterized in that the superantigen activity is induced by the env gene of MSRV-1 referenced in SEQ ID No. 1 or a fragment of said gene.

15 23. A human retrovirus, in particular an endogenous retrovirus, which has superantigen activity and is associated with an autoimmune disease, characterized in that the retrovirus is MSRV-1 and in that the superantigen activity is induced by the expression of
20 the env gene of MSRV-1 or of a fragment of said gene, in particular a fragment of said gene encoding at least one reading frame of the env protein of MSRV-1 (SEQ ID No. 2).

24. A human retrovirus, in particular an endogenous retrovirus, which has superantigen activity and is associated with an autoimmune disease, characterized in that the retrovirus is MSRV-1 and in that the superantigen activity is induced by the env protein of MSRV-1 or by a fragment of said protein, in particular
25 by a fragment corresponding to at least one reading frame of said protein (SEQ ID No. 2).

30 25. A nucleic acid molecule comprising at least one or more fragment(s) of the RNA or of the DNA of the env gene of MSRV-1, identified by SEQ ID No. 1, said fragment being at least 18 nucleotides, and preferably at least 24 nucleotides, in length.

35 26. The nucleic acid molecule as claimed in claim 25, comprising at least one fragment encoding at least

This Page Blank (uspto)

one reading frame and optionally containing a stop codon.

27. The nucleic acid molecule as claimed in claim 26, encoding superantigen activity.

5 28. A polypeptide molecule, in particular protein or protein fragment comprising at least one or more fragment(s) of said env protein of MSRV-1 identified by SEQ ID No. 2, said fragment being at least 6 amino acids, and preferably at least 8 amino acids, in
10 length.

29. The polypeptide molecule as claimed in claim 28, comprising at least one reading frame.

30. The polypeptide molecule as claimed in claim 29, having superantigen activity.

15 31. A vector comprising nucleic acid molecules as defined in claims 25 to 27.

32. A method for detecting superantigen activity in a biological sample from patients suffering from multiple sclerosis, characterized in that a majority 20 expansion of lymphocytes bearing a V β 7 determinant or a majority loss of lymphocytes bearing a V β 7 determinant is demonstrated.

33. The method as claimed in claim 32, characterized in that:

25 (i) a culture supernatant of blood mononucleated cells or of choroid plexus cells or of leptomeningeal cells, said cells originating from patients suffering from an autoimmune disease or suspected of having a risk of developing the disease,
30 in particular multiple sclerosis, or of an established cell line, such as the cells of the PLI-2 cell line deposited at the ECACC on July 22, 1992, under the number 92072201 and the LM7PC cell line deposited at the ECACC on January 8, 1993, under the number
35 93010817, in accordance with the provisions of the Treaty of Budapest, is sampled, and

(ii) said culture supernatant, or a part of the culture supernatant is brought into contact with a

This Page Blank (uspto)

series of cultures, preferably at least three, of blood mononucleated cells originating from healthy donors, and

(iii) said expansion and, optionally, a co-expansion, or said loss and, optionally, co-decrease of the blood mononucleated cells of step (ii) are detected.

34. The method as claimed in claim 33, characterized in that the blood mononucleated cells originating from patients suffering from MS are chosen from B lymphocytes and monocytes and the blood mononucleated cells originating from healthy donors are chosen from T lymphocytes.

35. The method as claimed in claim 32, characterized in that:

(i) blood mononucleated cells are sampled, said cells originating from patients suffering from an autoimmune disease or from patients suspected of having a risk of developing an autoimmune disease, in particular MS, and from healthy individuals,

(ii) said blood mononucleated cells originating from patients or from healthy individuals are brought into contact with culture supernatants, or a fraction of culture supernatant, of cells chosen from blood mononucleated cells, choroid plexus cells and leptomeningeal cells, and cells derived from established cell lines, such as the cells of the PLI-2 cell line deposited at the ECACC on July 22, 1992, under the number 92072201 and the LM7PC cell line deposited at the ECACC on January 8, 1993, under the number 93010817, in accordance with the provisions of the Treaty of Budapest, and

(iii) said expansion and, optionally, co-expansion, or said loss and, optionally, co-decrease, using the blood mononucleated cells of step (i) are detected.

36. The method as claimed in claim 32, characterized in that the superantigen activity is

This Page Blank (uspto)

This Page Blank (uspto)

demonstrated according to a protocol as described in claims 10 to 12, using a ligand or amplification combined with electrophoresis.

37. The method for detecting superantigen activity
5 as claimed in any one of claims 1 to 6, characterized
in that

(i) a polypeptide, in particular a recombinant protein, as identified by SEQ ID No. 2, or a fragment of said polypeptide or of said protein, is produced or
10 synthesized,

(ii) said polypeptide or said protein is brought into contact with a series of cultures, preferably at least three, of blood mononucleated cells originating from healthy donors, and

15 (iii) said expansion and, optionally, a co-expansion, or said loss and, optionally, co-decrease, of the blood mononucleated cells of step (ii) are detected.

38. The method for detecting superantigen activity
20 as claimed in any one of claims 1 to 6, characterized in that:

(i) blood mononucleated cells are sampled, said cells originating from patients suffering from an autoimmune disease or from patients suspected of having
25 a risk of developing an autoimmune disease, in particular MS, and from healthy individuals,

(ii) said blood mononucleated cells originating from patients or from healthy individuals are brought into contact with a polypeptide or a recombinant protein, as identified in SEQ ID No. 2, or a fragment
30 of said polypeptide or of said protein, and

(iii) said expansion and, optionally, co-expansion, or said loss and, optionally, co-decrease, using the blood mononucleated cells of step (i) are
35 detected.

39. The method as claimed in claim 38, characterized in that a polypeptide as defined in claims 28 to 30 is used.

This Page Blank (uspto)

40. The method as claimed in claim 37 or 38, characterized in that said polypeptide is encoded by a nucleic acid as defined in claims 26 to 27 or a vector as claimed in claim 31.

5 41. A method for evaluating the effectiveness of an agent or of a composition in inhibiting superantigen activity in a biological sample, characterized in that

- i) a culture supernatant of blood mononucleated cells, or of choroid plexus cells or of leptomeningeal

10 cells, said cells originating from patients suffering from an autoimmune disease, in particular MS, or of cells of an established cell line, such as the cells of the PLI-2 line and the LM7PC line, is sampled,

- ii) said supernatant, or a part of the culture

15 supernatant, is brought into contact with a series of cultures, preferably at least three, of blood mononucleated cells originating from healthy donors, in the presence of said agent or of said composition at predetermined doses, and

- 20 (iii) the inhibition of said expansion and, optionally, co-expansion, or the inhibition of said loss and, optionally, co-decrease, of the lymphocytes bearing at least one determinant chosen from V β 16, V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, in particular V β 16 and/or V β 17, V β 16, V β 3 and V β 12 or V β 16, V β 7, V β 14 and V β 17, particularly V β 16, V β 7 and V β 17, are detected using a ligand as described in claims 10 and 11 or amplification combined with electrophoresis as described in claim 12.

30 42. A method for evaluating the effectiveness of an agent or of a composition in inhibiting superantigen activity in a biological sample, characterized in that

- 35 (i) a polypeptide, in particular a recombinant protein is produced or synthesized,
- (ii) said polypeptide or recombinant protein is brought into contact with a series of cultures, preferably at least three, of blood mononucleated cells originating from healthy donors, in the presence of

This Page Blank (uspto)

said agent or of said composition at predetermined doses, and

(iii) the inhibition of said expansion and, optionally, co-expansion, or the inhibition of said loss and, optionally, co-decrease, of the lymphocytes bearing at least one determinant chosen from V β 16, V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, in particular V β 16 and/or V β 17, V β 16, V β 3 and V β 12 or V β 16, V β 7, V β 14 and V β 17, particularly V β 16, V β 7 and V β 17, are detected using a ligand as described in claims 10 and 11 or amplification combined with electrophoresis as described in claim 12.

43. A method for evaluating the effectiveness of an agent or of a composition in inhibiting superantigen activity in a biological sample, characterized in that

(i) blood mononucleated cells are sampled, said cells originating from patients suffering from an autoimmune disease or suspected of having a risk of developing the disease, in particular MS, and from healthy individuals,

(ii) said blood mononucleated cells originating from patients or from healthy individuals are brought into contact with culture supernatants, or a fraction of culture supernatant, of cells chosen from blood mononucleated cells, choroid plexus cells, leptomeningeal cells and cells derived from established cell lines, such as the cells of the PLI-2 cell line and the LM7PC cell line, and

(iii) the inhibition of said expansion and, optionally, co-expansion, or the inhibition of said loss and, optionally, co-decrease, of the lymphocytes bearing at least one determinant chosen from V β 16, V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, in particular V β 16 and/or V β 17, V β 16, V β 3 and V β 12 or V β 16, V β 7, V β 14 and V β 17, particularly V β 16, V β 7 and V β 17, using the blood mononucleated cells of step (i), in the presence of said agent or of said composition at given doses, are detected using a ligand as described in claims 10

This Page Blank (uspto)

and 11 or amplification combined with electrophoresis as described in claim 12.

44. A method for evaluating the effectiveness of an agent or of a composition in inhibiting superantigen 5 activity in a biological sample, characterized in that

(i) blood mononucleated cells are sampled, said 10 cells originating from patients suffering from an autoimmune disease or suspected of having a risk of developing the disease, in particular MS, and from healthy individuals,

(ii) said blood mononucleated cells originating 15 from patients or from healthy individuals are brought into contact with a polypeptide or a recombinant protein, and

(iii) the inhibition of said expansion and, 20 optionally, co-expansion, or the inhibition of said loss and, optionally, co-decrease, of the lymphocytes bearing at least one determinant chosen from V β 16, V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, in particular V β 16 and/or V β 17, V β 16, V β 3 and V β 12 or V β 16, V β 7, V β 14 25 and V β 17, particularly V β 16, V β 7 and V β 17, using the blood mononucleated cells of step (i), in the presence of said agent or of said composition at given doses, are detected using a ligand as described in claims 10 and 11 or amplification combined with electrophoresis 30 as described in claim 12.

45. The method as claimed in any one of claims 41 to 44, characterized in that the cells originate from a patient suffering from an autoimmune disease, in 35 particular multiple sclerosis.

46. The method as claimed in any one of claims 41 to 45, characterized in that the blood mononucleated cells originating from patients suffering from MS are chosen from B lymphocytes and monocytes.

35 47. A method for evaluating the prophylactic and/or therapeutic effectiveness of an agent or of a composition with respect to a pathological condition and/or to a predisposition to a pathological condition,

This Page Blank (U)

characterized in that inhibition of superantigen activity in a biological sample is demonstrated as described in claims 41 to 46.

48. The method as claimed in claim 47,
5 characterized in that the inhibition of the majority loss of lymphocytes bearing a V β 16 determinant and the co-decrease of lymphocytes bearing V β 7 and V β 17 are demonstrated.

49. The method as claimed in claim 46,
10 characterized in that the inhibition of the majority expansion of lymphocytes bearing a V β 16 determinant and the co-expansion of lymphocytes bearing V β 3 and V β 12 are demonstrated.

50. The method as claimed in either of claims 48
15 and 49, characterized in that the cells originate from a patient suffering from an autoimmune disease, such as multiple sclerosis.

51. The method as claimed in claims 48 to 50,
20 characterized in that the blood mononucleated cells originating from patients suffering from MS are chosen from B lymphocytes and monocytes.

52. A method for evaluating the prophylactic and/or therapeutic effectiveness of an agent or of a composition with respect to a pathological condition
25 and/or to a predisposition to a pathological condition, characterized in that inhibition of superantigen activity in a biological sample is demonstrated as described in claims 48 to 51.

53. Composition for therapeutic and/or prophylactic use, characterized in that it comprises, inter alia, a therapeutic agent capable of inhibiting superantigen activity in a biological sample, as defined in claims 41 to 52, optionally in combination with a pharmaceutically acceptable excipient and/or adjuvant
35 and/or diluent.

54. The composition as claimed in claim 53, characterized in that the therapeutic agent is an antiviral agent, more particularly an antiretroviral

This Page Blank (uspto)

agent, in particular a human antiretroviral agent, preferably an anti-MSRV1 agent, such as an inhibitor of the replication cycle and/or of the expression of a retrovirus, such as an anti-retroviral protein antibody, in particular an anti-envelope antibody, such as antisense oligonucleotides, more particularly which block retroviral expression.

5 55. Composition as claimed in claim 53, characterized in that the therapeutic agent is chosen from a natural molecule and/or a recombinant molecule, or a fragment of said molecules, the protein sequence of which corresponds to the sequence of the V β 16 and/or V β 17 molecules, preferably the V β 16 molecule, optionally in combination with one or more natural 10 and/or recombinant molecules, or a fragment of said molecules, the protein sequence of which corresponds to the sequence of the V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 15 and V β 22 molecules, and preferentially of the V β 3 and V β 12 molecules.

20 56. Composition as claimed in claim 53, characterized in that the therapeutic agent is chosen from a natural molecule and/or a recombinant molecule, or a fragment of said molecules, the protein sequence of which corresponds to the sequence of the V β 16 and/or V β 17 molecules, and optionally in combination with one 25 or more natural and/or recombinant molecules or a fragment of said molecules, the protein sequence of which corresponds to the V β 7, V β 14 and V β 17 molecules, and preferentially of the V β 7 and V β 17 molecules.

30 57. The composition as claimed in claim 53, characterized in that the therapeutic agent is chosen from the natural and/or recombinant and/or synthetic molecules, or a fragment of said molecules, which encode the molecules as defined in claims 53 to 56.

35 58. The composition as claimed in claim 57, characterized in that the therapeutic and/or prophylactic agent is chosen from the therapeutic genes comprising DNA and/or RNA molecules.

This Page Blank (uspto)

59. The prophylactic and/or therapeutic composition as claimed in claim 53, characterized in that the prophylactic and/or therapeutic agent is chosen from antisense oligonucleotides and antigene oligonucleotides.

60. The prophylactic and/or therapeutic composition as claimed in claim 53, characterized in that the prophylactic and/or therapeutic agent is chosen from at least one ligand capable of interacting with V β 16 and/or V β 17, in particular V β 16, optionally in combination with at least one ligand capable of interacting with at least one of V β 2, V β 3, V β 7, V β 8, V β 12, V β 14, V β 17 and V β 22, and preferentially V β 3 and V β 12.

61. The composition as claimed in claim 60, characterized in that the ligand is capable of interacting with a retrovirus, in particular a human retrovirus, such as MSRV-1, its proteins and/or its nucleic acids.

62. The composition as claimed in claim 60, characterized in that the ligand is an antiviral agent, more particularly an antiretroviral agent, in particular a human antiretroviral agent, preferably an anti-MSRV1 agent, such as an inhibitor of the replication cycle and/or of the expression of a retrovirus, such as an anti-retroviral protein antibody, in particular an anti-envelope antibody, such as antisense oligonucleotides, more particularly which block retroviral expression.

63. The composition as claimed in claim 60, characterized in that the ligand is chosen from antibodies, preferably monoclonal antibodies and anti-receptors for the TCRs of the various V β s.

64. The composition as claimed in claim 61, characterized in that the ligand is chosen from anti-MSRV-1 antibodies, preferably monoclonal antibodies.

65. The prophylactic and/or therapeutic composition as claimed in claim 53, characterized in that the

This Page Blank (uspto)

prophylactic and/or therapeutic agent is chosen from at least one ligand capable of interacting with V β 16 and/or V β 17, optionally in combination with at least one ligand capable of interacting with at least one of 5 V β 7, V β 14, v β 17 and V β 22, and preferentially V β 7 and V β 17.

66. The composition as claimed in claim 60, characterized in that the ligand is capable of interacting with a retrovirus, in particular a human 10 retrovirus, such as MSRV-1, its proteins and/or its nucleic acids.

67. The composition as claimed in claim 63 or 65, characterized in that the ligand is chosen from antibodies, preferably monoclonal antibodies and anti- 15 receptors for the TCRs of the various V β s.

68. The composition as claimed in claim 63 or 64, characterized in that the ligand is chosen from anti-MSRV-1 antibodies, preferably monoclonal antibodies.

69. A therapeutic and/or prophylactic composition, 20 characterized in that the therapeutic and/or prophylactic agent is an agent capable of blocking the interaction of the superantigen with the antigen-presenting cells.

70. A therapeutic and/or prophylactic composition, 25 characterized in that the therapeutic and/or prophylactic agent is chosen from at least one cell, preferably a cell of mammalian origin, genetically modified *in vitro* with a therapeutic agent which consists of at least one nucleic acid molecule encoding 30 at least one molecule, the protein sequence of which corresponds to the sequence encoding the molecules as defined in claims 1 to 5, 10, 20 to 31 and 53 to 59, in particular a DNA and/or RNA molecule.

71. The composition as claimed in claim 53, 35 characterized in that the therapeutic and/or prophylactic agent is chosen from at least one cell, preferably a cell of mammalian origin, genetically modified *in vitro* with a therapeutic agent which

This Page Blank (uspto)

consists of at least one nucleic acid molecule encoding at least one ligand defined in claims 60 to 69, in particular a DNA and/or RNA molecule.

72. The use of a composition as defined in claims 5 53 to 71, for the prophylaxis and/or the treatment of a pathological condition, in particular an autoimmune disease such as multiple sclerosis.

73. A method for identifying substances capable of blocking the transcription and/or the translation of a 10 human retrovirus, in particular a retrovirus which is endogenous, as defined in claims 23 and 24, and which has superantigen activity, said superantigen activity being associated with an autoimmune disease, according to which,

15 the substance is brought into contact with cells expressing a retroviral polypeptide as defined in claims 28 to 30 which has superantigen activity, and a loss or decrease of the superantigen activity is detected as described in claims 1 to 6.

20 74. A kit for screening substances capable of blocking the superantigen activity of a retrovirus, in particular an endogenous human retrovirus, associated with an autoimmune disease, or capable of blocking the transcription and/or the translation of said 25 retrovirus, comprising:

cells expressing, at their surface, class II MHC products, transformed with and functionally expressing a retroviral superantigen,

30 cells bearing receptor chains having one or more V β s stimulated by the retroviral superantigen, and means for detecting a loss or decrease of the superantigen activity as described in claims 1 to 6.

75. The use of substances capable of inhibiting a function of a human retrovirus, in particular an 35 endogenous retrovirus, for preparing a medicinal product for use in therapy and/or prevention of an autoimmune disease associated with a retroviral superantigen, in particular associated with MS.

This Page Blank (uspto)

76. The use as claimed in claim 75, in which the substance is AZT or DDI.

77. The use of substances capable of inhibiting the superantigen function of a human retrovirus, in particular an endogenous retrovirus, for preparing a medicinal product for use in the therapy of an autoimmune disease associated with a retroviral superantigen, in particular associated with MS.

This Page Blank (uspto)

TRAITE D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION & ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 24 octobre 2000 (24.10.00)	en sa qualité d'office élu
Demande internationale n° PCT/FR00/00691	Référence du dossier du déposant ou du mandataire MD/B05B3352
Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 mars 2000 (20.03.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 19 mars 1999 (19.03.99)
Déposant PERRON, Hervé etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

04 octobre 2000 (04.10.00)

[] dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

<p>Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse</p> <p>no de télécopieur: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>Antonia Muller</p> <p>no de téléphone: (41-22) 338.83.38</p>
--	---

This Page Blank (uspto)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire MD/B05B3352	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/00691	Date du dépôt international (<i>jour/mois/année</i>) 20/03/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (<i>jour/mois/année</i>)) 19/03/1999
Déposant BIO MERIEUX et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend **5** feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
 - la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
 - contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
 - La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

DETECTION D'UNE ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE DANS UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE

5. En ce qui concerne l'abrégué,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégué est la Figure n°

- suggérée par le déposant.
- parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

This Page Blank (uspk)

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.1

Bien que la revendication 72 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés à la composition.

Suite du cadre I.1

Revendications nos.: 72

Règle 39.1(iv) PCT - Méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 53-68, 70, 71

Les revendications 53-68, 70 et 71 présentes ont trait à une très grande variété de compositions (cf. composition caractérisée en ce qu'elle comprend un agent d'inhiber une activité superantigénique, telle que définie dans les revendications 41 à 52). Un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces compositions revendiquées. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux compositions (cf. composition caractérisée en ce qu'elle comprend un agent d'inhiber une activité superantigénique).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

This Page Blank (uspto)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

/FR 00/00691

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 7	G01N33/569	G01N33/68	G01N33/50	G01N33/564	G01N33/566
	G01N33/574	A61K39/00			

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199800529131, abrégé XP002139048 & H. PERRON ET AL. : "Retrovirus, cytotoxic molecules including superantigen and multiple sclerosis: Epiphénomène or new avenue of research" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, vol. 90, no. 1, 23 août 1998 (1998-08-23), page 68 Montreal Canada</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	23-31

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

6 juin 2000

26/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van Bohemen, C

This Page Blank (uspto)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 00/00691

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS Philadelphia PA USA; abstrcat no. PREV199699194041, abrégé XP002139428 & B.A. TORRES ET AL.: "HIV encodes for its own CD4 T-cell superantigen mitogen" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 225, no. 2, 1996, pages 672-678, New York NY USA ---	53-71
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 7, 16 août 1993 (1993-08-16) Columbus, Ohio, US; abstract no. 69990, XP002123380 abrégé & E. JOUVIN-MARCHE ET AL.: "Identification of endogenous superantigens reacting with T cell receptor of V.beta.17 chains" EOS RIV IMMUNOL IMMUNOFARMACOL, vol. 13, no. 1, 1993, pages 74-75, Paris ---	1-77
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 21, 22 novembre 1993 (1993-11-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 223499, XP002123381 abrégé & N. LABRECQUE ET AL.: "T-cell recognition of superantigens: another view." RES IMMUNOL, vol. 144, no. 3, 1993, Montreal ---	1-77
A	WO 98 26747 A (D. S. TERMAN) 25 juin 1998 (1998-06-25) revendications 1,20 -----	1-77

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 00/00691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9826747	A 25-06-1998	NONE	

This Page Blank (uspto)

et al., Transplantation 1996 62 : 1332 ; Hawke NA et al., J Immunol 1996 156 : 2458 ; Lim SH et al., Cancer Immunol Immunother 1996 42 : 69). Des réactions d'extension des amplicons sont ensuite réalisées en utilisant d'une part des oligonucléotides TCR-BC fluorescents, et d'autre part des oligonucléotides TCR-BJ fluorescents (13 J beta). Ces produits d'amplicons marqués à la fluorescence présentent des tailles différentes du fait des réarrangements des gènes spécifiques de chaque clone T V β "x" et sont analysés sur gel d'électrophorèse, et la fluorescence associée à chaque bande sur le gel est lue et quantifiée à l'aide d'un PhosphorImager.

Ainsi on obtient des graphes dont le profil traduit l'amplification d'une famille de V β présente à la surface des cellules T (figure 3). Lorsque l'activation de la cellule T est de type polyclonal, plusieurs pics sont observés sur un même graphe, traduisant la présence de nombreuses molécules de la famille V β à la surface des cellules T.

15

Exemple 6 : Détection des cytokines produites.

Les cytokines inflammatoires (IL-6, TNF- α et INF- γ) ont été mesurées à l'aide de kits ELISA d'immunocapture Optalia (nom commercial) de chez Pharmingen-Becton-Dickinson, sur plaques de titration de 96 puits selon les recommandations du fabricant. Une référence constituée d'une gamme de dilutions de cytokine recombinante de concentration connue (en pg/ml) est incluse sur chaque plaque d'essai. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde 405 nm pour la lecture du chromogène ABTS (Boehringer Mannheim). La recherche des cytokines est effectuée dans 50 μ l de surnageants de culture 24 heures après la mise en contact pour 8 donneurs stimulés avec LBSEP ou LBTE et dans les surnageants de cultures 24 heures et 72 heures après la mise en contact pour 6 donneurs stimulés avec LES ou GRE.

Les résultats sont exprimés en pg/ml de surnageant, correspondant à la production de 2×10^6 cellules.

Tableau 2

5

	LBSEP	LBTE
IL-6 (n = 6)	714	220
INF-γ (n = 3)	716	383
TNF-α (n = 6)	83	54

Exemple 7 : Estimation du pourcentage de cellules en apoptose.

Le pourcentage de lymphocytes entrés en apoptose a été
10 mesuré dans les populations de PBL mises en culture pendant 24 heures
avec LBSEP ou LBTE- pour 8 donneurs, d'une part, et dans les populations
mises en culture avec LES et GRE pour 9 donneurs d'autre part.

L'apoptose a été estimée au cytofluorimètre en prenant en
compte les caractéristiques de taille et de granulométrie existant entre les
15 cellules vivantes et les cellules en apoptose, comme décrit pour les
lymphocytes Jurkat (Thoulouze *et al* J. Virol. 71, 7372-7380, 1997).

Le pourcentage d'apoptose dans les cultures de lymphocytes
stimulés avec LBSEP est significativement supérieur à celui obtenu dans les
cultures de lymphocytes stimulés par LBTE. (moyenne du pourcentage
20 d'apoptose de 38,35 pour LBSEP contre 28% pour LBTE).

Exemple 8 : Détection d'antigènes viraux dans les cultures de lymphocytes.

Deux mélanges d'anticorps ont été utilisés pour détecter la
25 présence d'antigènes viraux dans les lymphocytes humains cultivés en
présence d'extraits de SC de plexus choroïdes LES et GRE dans les mêmes

conditions que pour l'analyse de l'expansion des familles TCR (récepteur des cellules T) V β a été réalisée.

On a réalisé (i) un premier pool (pool 1) d'anticorps polyclonaux, obtenus chez le lapin avec 1 μ l de chacun des trois anticorps polyclonaux, et (ii) un deuxième pool (pool 2) d'anticorps monoclonaux obtenus après immunisation de souris avec 1 μ l de chacun des trois anticorps monoclonaux,. Ces anticorps polyclonaux et monoclonaux sont dirigés contre les protéines codées par les séquences *env*, *gag* et *pol* de MSRV-1 décrites dans les demandes de brevet WO-A-98/23755 et WO-A-10 99/02666.

Des lymphocytes humains provenant de donneurs sains (10^6 cellules par coloration) sont mis en contact 24 heures avec des surnageants ultracentrifugés de cellules de plexus choroïdes LES ou GRE. Les lymphocytes sont ensuite lavés dans du milieu RPMI. Le culot cellulaire est repris dans 500 μ l de tampon de fixation (tampon phosphate 3% de paraformaldéhyde) et incubé pendant 20 min. à 4°C. Après deux lavages dans un tampon de perméabilisation (tampon phosphate contenant 1% de sérum de veau fœtal, 0,1% d'azide de sodium, 0,1% de saponine), les cellules fixées sont incubées pendant 30 min. à 4°C avec 3 μ l de chacun 15 des pools anti-MSRV-1, dans un volume final de 50 μ l de tampon de perméabilisation. Après un lavage dans du tampon de perméabilisation, les cellules incubées avec les anticorps anti-MSRV-1 du pool 1 sont incubées 20 30 min. à 4°C avec des anticorps biotinylés dirigés contre les immunoglobulines de lapin (Byosis, dilution 1/2000), lavées, puis incubées 25 30 min. à 4°C avec de la strepavidine couplée à de l'isothiocyanate de fluoroscéine (Strep-FITC 1/50^e, Immunotech Coulter-Beckman). Les cellules incubées avec les anticorps anti-MSRV-1 du pool 2 sont incubées avec des anticorps couplés à la biotine dirigés contre les anticorps de souris (Amersham, 1/500), puis, après lavage, avec de la Strep-FITC. Les cellules

resuspendues dans 250 µl de Cell-fix sont ensuite analysées par cytofluorimétrie.

Exemple 9 : Analyse des répertoires V β des lymphocytes CD3.

5 L'analyse des répertoires des huit donneurs est réalisée par double marquage sur des cellules mises en contact 24 heures, soit avec LBSEP, soit avec LBTE. Ces mêmes donneurs ont été testés en présence de LES et GRE.

10 Le pourcentage de cellules exprimant un V β particulier parmi les lymphocytes CD3 dans les cultures de lymphocytes stimulées par LBSEP est comparé à celui obtenu dans les cultures stimulées par LBTE. Les répertoires V β utilisés par deux donneurs (donneur 1 et donneur 5) en réaction à LBSEP (histogrammes sombres) et à LBTE (histogrammes clairs) sont présentés sur les Figures 1 (donneur 1) et 2 (donneur 5). Pour le 15 donneur 1, les pourcentages de V β utilisés pour répondre à LBSEP sont identiques à ceux utilisés pour répondre à LBTE, à l'exception de V β 7. En revanche, pour le donneur 5, le pourcentage de V β 3 et de V β 16 recrutés par LBSEP est différent de ceux recrutés par LBTE (respectivement 8.2 et 13.6 pour V β 3 et 2.1 et 4.2 pour V β 16).

20 Une augmentation de 31% d'une famille V β par rapport au pourcentage obtenu dans les cultures de lymphocytes LBTE est considérée comme la marque d'une expansion significative d'une famille de V β particulier par LBSEP.

25 L'analyse comparative utilisant ce critère est présenté dans le tableau 3 ci dessous.

Tableau 3

Nº	HLA	Vβ2	Vβ3	Vβ5	Vβ7	Vβ8	Vβ12	Vβ13	Vβ14	Vβ16	Vβ17	Vβ21	Vβ22
1	DR 2/4				X								
4	DR 13/8							X			X		
5	DR 13/14		X								X		
7	DR 3/12											X	
8	DR 3/7		X								X		
9	DR 3/13					X					X		
10	DR 4/5		X				X		X	X			X
11	DR 4/4	X					X			X			
	% age	12,5	37,5	0	13	13	37,5	0	12,6	75	12,5	0	12,5

Après un contact avec les LBSEP, on observe que :

75 % (6/8) des donneurs présentent une expansion de la famille

Vβ 16,

37,5 % (3/8) des donneurs présentent une expansion de la famille Vβ 12,

37,5 % (3/8) des donneurs présentent une expansion de la famille Vβ 3, et

12,5 % (1/8) des donneurs présentent une expansion de l'une des familles Vβ 2, 7, 8, 14, 17 ou 22.

Les résultats obtenus avec les préparations LES et GRE peuvent être illustrés par l'analyse des répertoires obtenus avec les donneurs 10 et 11. GRE induit l'expansion de Vβ 16. Les expansions obtenues avec GRE sont du même ordre et de même nature que celles obtenues avec LBSEP.

L'expansion V β 16 n'est pas liée à la présence d'un DR particulier, puisqu'elle peut être obtenue aussi bien dans un environnement DR3 que DR4, DR5, DR8, DR13 ou DR14, c'est à dire avec 6 des 8 haplotypes exprimés par les 6 donneurs.

5 LBSEP n'induit généralement chez les donneurs l'expansion majoritaire que d'une ou deux familles V β , sauf dans deux cas : un donneur présente à la fois une expansion des V β 3,12,14,16 et 22, un autre à la fois de V β 12 et V β 16. Les haplotypes de ces deux donneurs sont DR4/4 et DR4/5 respectivement.

10

Exemple 10 : Analyse du répertoire V β des lymphocytes T par biologie moléculaire.

L'expérimentation est réalisée comme décrite dans l'exemple 5. Des cellules PBL de donneurs sains différents (donneur 7, 14, 19 et 18) 15 sont récupérées et mises en contact avec des culots centrifugés de surnageants de cellules B issues de patients SEP ou d'individus sains. Des amplification du déterminant V β 16 ou V β 17 sont réalisées (voir figures 4A et 4B).

Amplification du déterminant V β 16

20 A : Donneur sain 7 et cellules B de témoin sains
B : Donneur sain 7 et cellules B de patients SEP
C : Donneur sain 14 et cellules B de patients SEP
D : Donneur sain 14 et milieu de culture
E : Donneur sain 19 et cellules B de patients SEP
25 F : Donneur sain 19 et cellules d'individu sain
G : Donneur sain 19 et milieu de culture
H : Donneur sain 18 et cellules B de patient SEP
I : Donneur sain 18 et cellules d'individu sain
J : Donneur sain 18 et cellules d'individu sain

30

Amplification du déterminant V β 17

A : Donneur sain 17 et cellules B de patient SEP

B : Donneur sain 17 et cellules B d'individu sain

C : Donneur sain 17 et milieu de culture

5 Les graphes nous montrent que nous avons un profil différent de la même famille de V β 16, voire V β 17 amplifiée après incubation avec les cellules B de patients SEP ou avec les cellules B d'individu sain, pour un même donneur sain de PBL. Ces profils sont polyclonaux. Cela traduit bien l'activation polyclonale des cellules du donneur sain après une incubation
10 avec des culots concentrés de surnageants de cellules B de patients SEP, différente de celle avec des culots concentrés de surnageants de cellules B d'individu sain. Cette activation polyclonale traduit la présence d'un ou plusieurs superantigène(s) ou superantigène-like dans les culots concentrés de SEP. Cette analyse par biologie moléculaire de l'expansion des cellules T
15 de déterminant V β 16 suite à l'incubation en présence de culots concentrés de SEP confirme l'observation réalisée après analyse par immuno-détection en détectant directement les déterminants V β s membranaires par des anticorps spécifiques, comme décrit dans l'exemple 9.

20

Exemple 11 : Mise en évidence de l'expansion ou de la perte des lymphocytes porteurs de V β associée à la SEP.

Des suspensions de PBL 'Peripheral Blood Lymphocytes' prélevés à partir de donneurs sains (donneurs 5, 7, 14, 15, 19) sont mis en
25 contact avec des culots concentrés de surnageants de lignées cellulaire B (ACX, FEX, BUX) établies à partir de prélèvements sanguins de patients SEP, comme décrit dans l'exemple 3. En parallèle ces suspensions sont mises en contact avec des culots concentrés de surnageants de lignées cellulaires B (T8, T9) établies à partir de prélèvements sanguins de patients
30 sains. Après incubation, le répertoire V β des cellules CD3 est analysé par

immuno-détection comme décrit dans l'exemple 4. Une prolifération majeure des cellules T présentant le déterminant V β 16 est observée, ainsi qu'une prolifération de cellules T avec V β 7, 14, 17 (tableau 4); ainsi comme décrit précédemment, une activité superantigénique est mise en évidence induite par les culots concentrés de surnageants de lignées B issues de patients SEP. Les pourcentages de prolifération des cellules T *in vitro* est estimé comme décrit précédemment. Parallèlement, il est clairement montré dans cet exemple, qu'il peut y avoir également, avec des donneurs sains différents, une diminution des sous populations de cellules T portant ces mêmes V β s 16, 7, 14, 17 pour d'autres donneurs. Cette diminution peut refléter une mise en anergie ou en apoptose des cellules suite à l'effet superantigénique induit par les culots concentrés de surnageants cellulaires issus de patients SEP. Il est à noter que 100% des suspensions PBL saines testées répondent soit par une expansion cellulaire soit par une diminution du nombre de cellules T présentant le déterminant V β 16, suite à une incubation avec les culots concentrés de surnageants de cellules B issues de patients SEP, et possédant une activité superantigénique.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous

20

Tableau 4

Donneur	HLA DR	V β 2	V β 7	V β 14	V β 16	V β 17
5	13/14	+ 7,6	- 38	- 28	- 49	- 31
7	3/12	- 6	- 21	+ 37	+ 315	- 24
14	4/14				+ 37	+ 5,13
15	3/13	+ 11	- 24	+ 65	- 72	- 2
19	4/15				+ 56	

Exemple 12 : Stimulation de la production de cytokines.

Les cultures de lymphocytes stimulés par LBSEP se distinguent par des productions significativement supérieures d'IL-6 et d'INF- γ comparées à celles stimulées par LBTE. Les titres de TNF- α sont très faibles en revanche et équivalents pour les deux types de cultures. Les résultats, exprimés en pg/ml de culture correspondant à 2×10^6 cellules. Ces résultats sont présentés dans le tableau 5.

10

Tableau 5

	LBSEP	LBTE
IL-6 (n = 6)	714	220
INF- γ (n = 3)	716	383
TNF- α (n = 6)	83	54

Exemple 13 : Détection d'antigènes viraux dans les cultures de lymphocytes.

15 La présence d'antigènes rétroviraux spécifiques a été recherchée à l'aide des deux pools d'anticorps dirigés contre des protéines de MSRV-1. Les résultats d'immunofluorescence sur les cultures inoculées avec du SC ultracentrifugé de LES ou GRE, obtenus avec les deux pools (pool 2 = monoclonaux de souris, pool 1 = polyclonaux de lapin) sont présentés dans
20 la table 4 pour les donneurs 10 et 11. Les chiffres représentent les pourcentages de cellules présentant des intensités de fluorescence comprises entre les canaux 100 et 1000.

Tableau 6

	Donneur 10		Donneur 11	
	LES	GRE	LES	GRE
Pool 1	0.6	22.6	0.4	4.76
Pool 2	7.11	30.77	0.12	4.69

5 Les résultats sont présentés comme des pourcentages de population exprimant une intensité de fluorescence comprise entre les canaux 100 et 1000.

10 L'expansion, parallèle à ces résultats concernant les antigènes MSRV-1, d'un nombre restreint de familles V β chez une majorité de donneurs en l'absence de restriction HLA indique que la réponse s'apparente à une réponse de type superantigène. La production de cytokines de type inflammatoire (IL-6, IFN- γ) conforte l'existence d'un environnement favorable au recrutement lymphocytaire.

15 L'absence de production de TNF- α est un argument en faveur de l'absence de contamination par des superantigènes bactériens ou du LPS.

Exemple 14 : Production d'anticorps monoclonaux.

La production d'anticorps monoclonaux par ascite impose une compatibilité du système H-2 entre l'hybridome et la souris productrice.

20 Des souris femelles Balb/c, âgées de 6 semaines, subissent une injection de 0.5ml de Pristane (2-6-10-14 acide tétraméthylpentadécane) dans leur cavité péritonéale, pour la production d'ascite (Porter et al., 1972). Une semaine à 10 jours plus tard, 5.10^6 à 10.10^6 hybridomes dilués dans environ 0.5ml de tampon stérile NaCl 0.145M, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM à pH 7.4. sont injectés par voie intrapéritonéale. L'ascite apparaît une à deux semaines plus tard. Les liquides d'ascites

présents dans la cavité péritonéale sont alors recueillis avec une seringue après incision du péritoine. Le liquide recueilli est centrifugé à 3000g pendant 15 minutes à température ambiante, filtré sur gaze pour éliminer le gras, puis tamponné en ajoutant 1/20^{ème} de son volume de tris-HCl 1M à 5 pH 8.0. Cette méthode permet d'obtenir des quantités d'anticorps 10 fois supérieures à celles obtenues par culture d'hybridomes.

Les immunoglobulines présentes dans le liquide d'ascite sont relarguées par les sels (sulfate d'ammonium ou sulfate de sodium). Le liquide d'ascite est précipité par le sulfate d'ammonium 40%. Après 10 minutes au froid la solution est centrifugée 15 minutes 8000g à 4°C. Le précipité est lavé et resuspendu à froid dans une solution de sulfate d'ammonium 40% puis de nouveau centrifugé. Le nouveau précipité enrichi 10 en IgG est remis en solution dans du tampon PBS et dialysé la nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4. Parallèlement une 15 colonne d'agarose-Protéine A (ou protéine G) (commercialisée sous forme lyophilisée, Pierce) est lavée extensivement avec le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4. La solution enrichie en IgG est déposé sur la colonne puis la colonne est lavée. Les IgG retenues par la colonne sont éluées à pH acide (glycine 200 mM pH 2.8). Les fractions éluées sont 20 neutralisées avec un volume de Tris-Base 1M pH 10.5. Le contenu en immunoglobulines de chaque fraction recueillie est quantifiée par lecture d'absorbance à 280 nm (e 1%,1cm = 14.0 Prahl et Porter 1968). Les fractions riches sont poolées. Le degré de purification des IgGs poolées est analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Les 25 IgGs purifiées sont dialysées une nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4, filtrées stérilement, aliquotées et conservées à -20°C. Leur concentration finale est déterminée par lecture de l'absorbance à 280 nm ou par dosage micro-BCA.

Mais, il est à la portée de l'homme du métier de définir d'autres 30 protocoles pour la production d'anticorps monoclonaux, par exemple à

partir des techniques décrites par Köhler et Milstein et par Galfre G. *et al.* précédemment cités ou des techniques dérivées de celles ci.

**Exemple 15 : Mesure de l'activité des cellules T par prolifération
cellulaire (Sredni *et al.*, 1981).**

Les cellules T sont lavées deux fois en milieu de culture pour éliminer toute trace d'IL2 présente dans le milieu initial de culture. Des lymphocytes B (EBV-LCL) ou des monocytes/macrophages pris comme cellules présentatrices de l'antigène, sont irradiées à 10000 rads, lavées deux fois avec du milieu de culture (RPMI). 2.10^4 cellules T (2.10^5 cellules /ml) et 2.10^4 cellules B autologues irradiées (2.10^5 cellules /ml) sont incubées ensemble en présence d'une gamme de concentration croissante de l'antigène sous un volume final de 200 μ l dans des micropuits. Après 48 heures de culture à 37°C, 1 μ Ci de 3H-thymidine dans 50 μ l de milieu RPMI est ajouté dans chaque puits. Les cellules T, seules à se diviser, incorporent la thymidine tritiée dans l'ADN. Après 18 heures de culture, les cellules de chaque micropuit sont récoltées sur des pastilles de laine de verre par aspiration. Après lyse osmotique des cellules, la radioactivité incorporée dans l'ADN est absorbée sur les pastilles (cell Harvester 530, Inotech). Chaque pastille séchée est placée dans un tube plastique qui contient 2 ml de scintillant ; la radioactivité b adsorbée sur chacune des pastilles est quantifiée dans un compteur beta à scintillation liquide (LKB Rackbeta 1217). Les résultats sont exprimés comme moyenne arithmétique de cpm /culture ('coups par minute').

25

Exemple 16 : Protocole de détection de l'association entre peptides et molécules d'histocompatibilité (approche APC transformées par un peptide se fixant aux molécules du CMHI ou CMHII)

1) Matériel (exemple pour la molécule du CMHI):

Les sources de molécules d'histocompatibilité sont actuellement de deux types principaux : les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174 (Salter and Cresswell Embo J 1986, 5: 943-949). Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter de peptides exogènes.

Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent également être utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1.5 M et de la soude 12.5 mM (pH 11.7) pendant 1 heure à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PDLO, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0.05% Tween 20, 2 mM EDTA, 0.1% NP40 et 6 mM CHAPS, en présence de 2 µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic et al., Eur J Immunol 1995 25 : 1638-1642). Les peptides testés ont en général 8 à 10 résidus, parfois 11 ou 12. Ils ont été synthétisés par Néosystems (Strasbourg), ou par Chiron mimotopes (Victoria, Australie). Ils sont utilisés à des concentrations variant de 100 µM à 0.1 nM.

2) Protocole de l'assemblage (Connan et al., Eur J Immunol 1994, 24 : 777 ; Couillin et al. Eur J Immunol 1995, 25 : 728-732).

Des aliquotes de $8 \cdot 10^5$ cellules dans un volume de 64 µl, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100 µM iodoacétamide, 2 µg /ml aprotinine, 10 µM leupeptine, 10 µM pepstatine et 10 µg/ml inhibiteur de trypsine). La

lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 tours /minute à 4°C, le surnageant est additionné de 140 µl de PBS contenant 0.05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg /ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 heures à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc, Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (10 µg /ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation de peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg /ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps permet la détection de l'assemblage des molécules d'histocompatibilité ciblées. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-552, Sigma) et est incubé pendant une heure à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 minutes à 20-25°C avec de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat le 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate (M-8883, Sigma) à 100 µM dans de la diéthanolamine 50 mM, pH 9.5 avec du MgCl₂ 1 mM. La lecture est faite à 340/460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre.

3) Stabilité des complexes HLA/peptides :

La stabilité des complexes précités a été étudiée car elle conditionne la bonne présentation de l'antigène et l'induction de la réponse T. A cet effet a été utilisé soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule. Avec le HLA purifié, les peptides endogènes ont été éliminés comme décrit en 2) puis mis en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C, pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque de 96 puits (comme décrit en 2)

avec l'anticorps anti-HLA se fait pendant une heure à 37°C. La révélation est effectuée de manière classique. Avec le lysat de la cellule, toutes les incubations sont également faites à 37°C, après ajout de tous les inhibiteurs de protéases.

5

Exemple 17: La protéine d'enveloppe MSRV reproduit la stimulation dominante de la population de lymphocytes T porteurs des chaînes V β s16, observée préalablement avec l'infection par la fraction contenant les particules virales.

10 L'analyse de l'expansion ou de la déplétion (perte) des sous populations de lymphocytes T a été effectuée par FACS sur des cellules mononucléées sanguines de donneurs sains globalement selon les protocoles décrits dans les exemples 2, 3, 4, 9 et 11.

15 Le tableau 7 montre les résultats obtenus avec un nouveau lot de virion SEP produit dans des cultures de plexus choroïdes de SEP, testé sur une nouvelle série de différents donneurs sains. Il montre la reproductibilité de la stimulation majoritaire V β 16 chez la plupart des donneurs sains (Don 12, 15, 16, 19 et 20). La faible réactivité de deux donneurs (Don 14 et 18) correspond à un faible pourcentage de donneurs 20 « non répondeurs » régulièrement observé dans les séries successives. La baisse parallèle de tous les V β s chez le donneur 13 évoque un problème de viabilité de ses cellules stockées dans l'azote et décongelées pour la culture. En conséquence, ce dernier donneur n'a plus été utilisé par la suite.

25

Tableau 7

	V β 2	V β 14	V β 16	V β 17
Don 12	-6	-8	50	-8

Don 13	-39	-27	-20	-52
Don 14	-19	-23	12	-4
Don 15	-30	0	75	-16
Don 16	-50	-66	88	-51
Don 18	-25	-31	5	-17
Don 19	-9	-14	43	-50
Don 20	0	17	67	0

La modification faite aux protocoles décrits dans les exemples sus nommés a consisté à remplacer l'ajout de la fraction contenant les virions produits par des cultures de cellules SEP par des protéines recombinantes produites à partir des séquences rétrovirales MSRV associées à ces mêmes sources de virions ou par le tampon de solubilisation seul.

Cette analyse a déjà permis de mettre en évidence des propriétés immunologiques de la protéine d'enveloppe du rétrovirus MSRV (env MSRV) reproduisant la stimulation majeure de la sous population lymphocytaire T V β 16 positive et une stimulation mineure de la sous population lymphocytaire T V β 17 positive.

Pour ce faire, un plasmide d'expression bactérienne a été obtenu avec l'insert ADN codant pour le cadre de lecture d'une protéine env MSRV, selon les techniques de biologie moléculaires bien connues de l'homme de l'art.

La séquence de l'insert est référencée en SEQ ID NO 1.

La séquence en acide aminés de la protéine recombinante exprimée à partir de ce plasmide est référencée en SEQ ID NO 2:

Le plasmide d'expression a permis de produire la protéine env MSRV, en fusion avec une terminaison "polyhistidine" (HIS-Tag) qui a permis de la purifier sur colonne d'affinité à partir de l'extrait de bactéries *E. coli* recombinantes dans lesquelles l'expression la protéine a été faite.

La protéine env recombinante a été purifiée et analysée par électrophorèse SDS PAGE, en présence de marqueurs de poids moléculaire. Les fractions d'élution spécifique de la protéine recombinante produite dans la fraction insoluble retenue par le HIS-Tag sur colonne d'affinité ont été récupérées. La correspondance avec la protéine fusionnée au HIS-Tag a été confirmée par Western blot, avec un anticorps spécifique du HIS-Tag, marquant la protéine de 60 KD retrouvée seule dans la fraction éluee, après

visualisation sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE. La fraction la plus riche (environ 0,5 mg/ml), a été utilisée pour être ajoutée aux cellules de donneurs sains dans le test immunologique faisant l'objet de cet exemple.

Les cellules mononucléées sanguines de trois donneurs (12, 15 et 16) ont été incubées parallèlement 3 jours en présence de 10 ng/ml et de 100ng/ml de la protéine env MSRV recombinante, ainsi que d'une dilution équivalente du tampon de solubilisation seul.

Après ces trois jours d'incubation, l'analyse du répertoire des V β s a montré, selon les critères d'analyses déjà décrits dans les exemples précédents, que les donneurs 12 et 16 ont répondu significativement, par une expansion de V β 16 et V β 17, à la présence de la protéine env MSRV. Le donneur 16 a de plus montré une expansion V β 2. Une réponse V β orientée n'a pas été retrouvée chez le donneur 15.

Les résultats sont résumés dans le tableau 8.

15

Tableau 8

Don 12	V β 2	V β 7	V β 14	V β 16	V β 17
10 ng/ml	13	-7	7	159	151
100 ng/ml	9	-9	8	212	156

20

Don 15	V β 2	V β 7	V β 14	V β 16	V β 17
10 ng/ml	10	4	32	-30	24
100 ng/ml	7	2	1	-4	6

Don 16	Vβ 2	Vβ7	Vβ14	Vβ16	Vβ17
10 ng/ml	80	-60	ND	52	156

Ceci indique que la protéine env MSRV peut être responsable de
5 la stimulation dominante des sous populations V β s16 observée avec la fraction virale totale contenant les particules MSRV-1 utilisée dans les exemples précédents, mais aussi des co-stimulations ou stimulations alternatives de quelques autres sous populations (ex. V β s 17 et 2) observées avec une fréquence moindre sur l'ensemble des donneurs sains
10 testés à ce jour.

Ces résultats indiquent aussi que les séquences MSRV-1 codant pour la protéine env sont susceptibles d'être prises parmi les séquences nucléotidiques décrites précédemment et que les variants protéiques env MSRV-1 sont susceptibles d'être pris parmi les séquences décrites auparavant, étant donné que la variabilité des séquences rétrovirales n'exclue pas la stabilité d'une propriété biologique particulière sur une majorité de variants.
15

Exemple 18: Abolition de la stimulation de type superantigénique des sous populations de lymphocytes T, par addition de médicaments anti-viraux.
20

L'analyse de l'expansion ou de la déplétion des sous populations de lymphocytes T a été effectuée par FACS sur des cellules mononucléées sanguines de donneurs sains selon la description faite dans les exemples 2,
25 3, 4, 9 et 11.

La modification faite au protocole décrit dans les exemples sus nommés a consisté à inoculer en parallèle, dans des puits contenant les

cellules mononucléées sanguines d'un même donneur sain: 1) une fraction contenant les virions produits par des cultures de cellules SEP, 2) la même fraction virale en présence d'AZT 12,5 μ M (Sigma), 3) la même fraction virale en présence de DDI (Sigma) 20 μ M. Ces cultures ont été effectuées 5 sur les cellules d'un donneur dont les cellules mononucléées sanguines avaient été congelées par aliquots et dont un ou plusieurs aliquots avaient montré un effet de type superantigénique en présence de virions provenant de cultures SEP (cf. tableau 7).

Par ailleurs des tests de toxicité avec l'AZT (Azido 10 Deoxythymidine) seul et le DDI (DiDeoxyInosine) seul, ont été effectués sur les mêmes cellules et n'ont montré aucune mortalité cellulaire significative.

L'étude avec les médicaments anti-rétroviraux a déjà permis de mettre en évidence l'action inhibitrice de ce type de médicament sur l'induction d'une stimulation de type superantigénique par une fraction 15 concentrée de surnageants de cultures de cellules provenant de patients atteints de SEP et contenant des particules rétrovirales associées à l'ARN de MSRV-1. Les résultats correspondant sont présentés dans le tableau 10 ci-dessous. La ligne intitulée « medium » correspond au milieu contenant le virion SEP sans anti-rétroviraux et les lignes intitulées DDI et AZT font 20 référence aux tests effectués en présence de ces inhibiteurs. L'analyse au FACS réalisée selon les exemples précédents, des sous populations T dans les différents puits de culture montre:

- Une expansion significative V β 16 des lymphocytes incubés en présence du virion "SEP" seul qui n'était pas retrouvée en présence de la 25 fraction "témoin virion" provenant de cultures de témoins "non-SEP".
- Une absence ou une inhibition d'expansion V β 16 des lymphocytes incubés en présence du virion "SEP" et de l'AZT.
- Une absence d'expansion V β 16 des lymphocytes incubés en présence du virion "SEP" et du DDI.

Tableau 10

Don 12	Vβ2	Vβ14	Vβ16	Vβ17
AZT	13	-6	7	0
DDI	-4	-21	-15	-11
Medium	-6	-8	50	-8

Don 20	Vβ2	Vβ14	Vβ16	Vβ17
AZT	-3	-15	-3	16
DDI	-5	-35	-33	-19
Medium	0	17	67	0

5

Au vu de ces résultats, il apparaît maintenant que tout médicament, molécule ou procédé thérapeutique ayant un effet inhibiteur, bloquant ou modulateur sur l'expression rétrovirale, notamment infectieuse et/ou endogène, peut être utilisé pour inhiber l'effet immunopathologique induit par le ou les agents pathogènes associés à la production de ces particules rétrovirales. Les caractéristiques générales de cet effet immunopathologique sont décrites dans la présente invention.

Au vu de ces résultats et de ceux des exemples 8 et 17, il apparaît maintenant que ces agents ou procédés thérapeutiques peuvent être choisis parmi les composés actifs sur l'expression du rétrovirus MSRV-1.

SEQ ID NO 1 :

ATGGCCCTCCCTTATCATACTTTCTTTACTGTTCTCTTACCCCTTCG
CTCTCACTGCACCCCTCCATGCTGCTGACAACCAGTAGCTCCCTAC
CAAGAGTTTCTATGGAGAACGCGGCTTCCGGAAATTATTGATGCCCATC
5 ATATAGGAGTTATCTAAGGGAAACTCCACCTCACTGCCACACCCATA
TGCCCCGCAACTGCTATAACTCTGCCACTCTTGCATGCATGCAAATACT
CATTATTGGACAGGGAAAATGATTAATCCTAGTTGTCTGGAGGAACCTGG
AGCCACTGTCTGTTGGACTTACCCATACCAAGTATGTCTGATGGGG
GTGGAATTCAAGGTCAAGGCAAGAGAAAAACAAGTAAAGGAAGCAATCTC
10 CCAACTGACCCGGGGACATAGCACCCCTAGCCCCTACAAAGGACTAGTT
CTCTCAAAACTACATGAAACCCCTCCGTACCCATACTCGCCTGGTGANCCT
ATTTAATACCACCCCTCACTCGGCTCCATGAGGTCTCAGCCCACACCC
CTAACTGTTGGATGTGCCTCCCCCTGCACCCAGGCCATACATTCAATC
CCTGTTCCCTGAACAATGGAACAACTTCAGCACAGAAATAAACACCACTT
15 CCGTTTTAGTAGGACCTCTGTTCCAATCTGGAAATAACCCATACCTCA
AACCTCACCTGTGTAAAATTAGCAATACTATAGACACACCAACAGCTCCA
ATGCATCAGGTGGTAACACACCTCCCACACGAATAGTCTGCCTACCCCTCAG
GAATATTTTTGTCTGTGGTACCTCAGCCTATCATTGTTGAATGGCTCTT
CAGAATCTATGTGCTCCTCTCATTCTAGTGCCCCCTATGACCATCTACA
20 CTGAACAAAGATTATAACAATCATGTCGTACCTAACGCCCCACAACAAAAG
AGTACCCATTCTCCTTTGTTATCAGAGCAGGAGTGCTAGGCAGACTAG
GTACTGGCATTGGCAGTATCACAACCTCTACTCAGTTCTACTACAAACTA
TCTCAAGAAATAATGGTGACATGGAACAGGTCACTGACTCCCTGGTCA
CCTTGCAAGATCAACTTAACCCCTAGCAGCAGTAGTCCTCAAAATCGA
25 AGAGCTTTAGACTTGCTAACGCCAAAAGAGGGGGAACCTGTTATTTT
AGGAGAAGAACGCTGTTATTATGTTAATCAATCCAGAATTGTCAGTGAGA
AAGTTAAAGAAATTGAGATCGAATACAATGTAGAGCAGAGGAGCTTCA
AAACACCGAACGCTGGGCCTCCTCAGCCAATGGATGCCCTGGACTCTC
CCCTTCTTAGGACCTCTAGCAGCTATAATTTTACTCCTCTTGGACCC
30 TGTATCTCAACTTCCTGTTAGTTGTCTCTTCCAGAATTGAAGCTGTA

AAGCTACAAATAGTTCTCAAATGGAACCCCAGATGCAGTCCATGACTA
AAATCTACCGTGGACCCCTGGACC GG CCTGCTAGACTATGCTCTGATGTT
AATGACATTGAAGTCACCCCTCCCGAGGAAATCTCAACTGCACAAACCC
TACTACACTCCAATTCACTAGTAGGAAGCAGTTAG

5

SEQ ID NO 2 :

MALPYHTFLFTVLLPPFALTAPPPCCCTSSSPYQEFLWRTRLPGNIDAPSYRSL
SKGNSTFTAHTHMPRNCYNSATLCMHANTHYWTGKMINPSCPGLGATVC
WTYFTHTSMSDGGGIQGQAREKQVKEAISQLTRGHSTPSPYKGLVLSKLHETL
10 RTHTRLVSLFNTTLTRLHEVSAQNPTNCWMCLPLHFRPYISIPVPEQWNNFSTEI
NTTSVLGPLVSNLEITHTSNLTCVKFSNTIDTTSSQCIRWVTPPTRIVCLPSGIF
FVCGTSAYHCLNGSSESMCFLSFLVPPMTIYTEQDLYNHVVPKPHNKRVPILPF
VIRAGVLGRLGTGIGSITTSTQFYYKLSQEINGDMEQVTDSLVTQDQLNSLAA
VVLQNRRALDLLTAKRGGTCLFLGEERCYYVNQSIVTEKVKEIRDRIQCRAEEL
15 QNTERWGLLSQWMPWTLPFLGPLAAIIFLLLFGPCIFNFLVFKFVSSRIEAVKLQIV
LQMEPQMOSMTKIYRGPLDRPARLCSDVNDIEVTPPEEISTAQPLLHSNSVGSS

Références bibliographiques sur les V β s.

Brenden N, et al., Differential MHC expression requirements for
5 positive selection of separate TCR V β families,. Immunogenetics. 1999
Jan;49(1):1-6.

Hodges E, et al., T cell receptor (TCR) V β gene usage in
bronchoalveolar lavage and peripheral blood T cells from asthmatic and
10 normal subjects,. Clin Exp Immunol. 1998 Jun;112(3):363-74.

Allen TM, et al., The T-cell receptor beta chain-encoding gene
repertoire of a New World primate species, the cotton-top tamarin,
Immunogenetics. 1996;45(2):151-60.
15

Yassai M, et al., Bacterial toxin superantigens stimulate all
members of susceptible VB gene families, Ann N Y Acad Sci. 1995 Jul
7;756:110-2.

20 Donahue JP, et al., Genetic analysis of low V beta 3 expression
in humans,. J Exp Med. 1994 May 1;179(5):1701-6.

Isono T, et al., Sequence and diversity of variable gene
segments coding for rabbit T-cell receptor beta chains,. Immunogenetics.
25 1994;39(4):243-8.

Levinson G, et al., Sequence and diversity of rhesus monkey T-
cell receptor beta chain genes, Immunogenetics. 1992;35(2):75-88.

Buitkamp J, et al., Vb6 T-cell receptor elements in artiodactyls: conservation and germline polymorphisms, Mamm Genome. 1993 Sep;4(9):504-10.

5 Johnston SL, et al., Diversity of alpha and beta subunits of T-cell receptors specific for the H4 minor histocompatibility antigen, Immunogenetics. 1997;46(1):17-28.

10 Huck S, et al., Variable region genes in the human T-cell rearranging gamma (TRG) locus: V-J junction and homology with the mouse genes, EMBO J. 1988 Mar;7(3):719-26.

15 Sherman LA, et al., Comparison of the H-2K^b-specific cytolytic T lymphocyte receptor repertoire in Ig^h recombinant strains, J Immunol. 1985 Jun;134(6):3569-73.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17 ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17.
2. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16.
3. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16.
4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et une co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement des V β s 3 et 12.
5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'on met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et d'une co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence au moins l'un quelconque des V β s 7, 14 et 17 et avantageusement des V β s 7 et 17.

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon biologique provient d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, en particulier la sclérose en plaques.

5 7. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que :

(i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une 10 maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la sclérose en plaques, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément 15 aux dispositions du Traité de Budapest, et

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

20 (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii).

25 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les monocytes et les lymphocytes B et les cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains sont choisies parmi les lymphocytes T.

9. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que :

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de 5 patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi 10 les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions 15 du Traité de Budapest, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

20 10. Procédé selon les revendications 7, 8 et 9, caractérisé en ce que ladite expansion et éventuellement co-expansion est mise en évidence par utilisation de ligands, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence des V β s 16, 3 et 12, et en ce que ladite perte et éventuellement co-diminution 25 est mise en évidence par utilisation de ligands, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence les V β s 16, 7, 14 et 17.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ligand est un anticorps, de préférence un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps.

5 12. Procédé selon la revendication 7, 8 et 9, caractérisé en ce que pour mettre en évidence ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution on réalise

10 (i) une extraction des ARN totaux des cellules mononucléées sanguines mises en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture SEP et en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture témoin,

(ii) une transcription inverse desdits ARN,

(iii) une amplification spécifique de chaque famille de V β s à l'aide d'un couple d'amorces déterminé,

15 (iv) un marquage par tout marqueur approprié des produits d'amplification obtenus,

(v) une électrophorèse desdits produits d'amplification et analyse des profils d'électrophorèse obtenus, à l'aide d'un détecteur approprié.

20

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes.

25

14. Procédé de détection d'un état pathologique ou d'une prédisposition à un état pathologique dans un échantillon biologique caractérisé en ce que l'on met en évidence au moins l'un des paramètres suivants :

30 une activité superantigénique, telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 13,

une stimulation de la production de cytokines, telles que l'IL-6 et INF- γ

une induction d'apoptose cellulaire.

5 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on détecte au moins deux des paramètres en association.

10 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'on détecte une activité superantigénique et une induction d'apoptose ou une activité superantigénique et une stimulation de la production de cytokines.

15 17. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on détecte les trois paramètres en association.

18. Procédé selon la revendication 7, 8 et 9, caractérisé en ce que l'état pathologique est associé à une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

20 19. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'activité superantigénique est induite directement ou indirectement par un agent effecteur choisi parmi les protéines et/ou les microorganismes et/ou les agents pathogènes.

25 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi parmi les bactéries et les rétrovirus, de préférence les rétrovirus humains, et en particulier le rétrovirus est MSRV-1 et en particulier l'agent pathogène est MSRV-2.

21. Procédé selon les revendications 19 et 20, caractérisé en ce que l'activité superantigénique est induite par la protéine d'enveloppe de MSRV-1 référencée en SEQ ID NO :2 ou par un fragment de ladite protéine.

5 22. Procédé selon les revendications 19 et 20, caractérisé en ce que l'activité superantigénique est induite par le gène *env* de MSRV-1 référencée en SEQ ID NO :1 ou un fragment dudit gène.

10 23. Rétrovirus humain, en particulier rétrovirus endogène, ayant une activité superantigénique et étant associé à une maladie auto-immune, caractérisé en ce que le rétrovirus est MSRV-1 et en ce que l'activité superantigénique est induite par l'expression du gène *env* de MSRV-1 ou d'un fragment dudit gène, en particulier un fragment dudit gène codant pour au moins un cadre de lecture de la protéine *env* de MSRV-1 (SEQ ID NO :2).

15 24. Rétrovirus humain, en particulier rétrovirus endogène, ayant une activité superantigénique et étant associé à une maladie auto-immune, caractérisé en ce que le rétrovirus est MSRV-1 et en ce que l'activité superantigénique est induite par la protéine *env* de MSRV-1 ou par un fragment de ladite protéine, en particulier par un fragment correspondant à au moins un cadre de lecture de ladite protéine (SEQ ID NO :2).

25 25. Molécule d'acide nucléique comprenant au moins un fragment ou des fragments de l'ARN ou de l'ADN du gène *env* de MSRV-1, identifié par SEQ ID NO :1, ledit fragment ayant une longueur d'au moins 18 nucléotides et de préférence d'au moins 24 nucléotides.

26. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 25 comprenant au moins un fragment codant pour au moins un cadre de lecture et contenant éventuellement un codon stop.

5 27. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 26, codant pour une activité superantigénique.

10 28. Molécule polypeptidique, en particulier protéine ou fragment de protéine comprenant au moins un fragment ou des fragments de ladite protéine env de MSRV-1 identifiée par SEQ ID NO :2, ledit fragment ayant une longueur d'au moins 6 acides aminés et de préférence d'au moins 8 acides aminés.

15 29. Molécule polypeptidique selon la revendication 28 comprenant au moins un cadre de lecture.

30. Molécule polypeptidique selon la revendication 29, ayant une activité superantigénique.

20 31. Vecteur comprenant des molécules d'acides nucléiques telles que définies dans les revendications 25 à 27.

25 32. Procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique de patients atteints de sclérose en plaques, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7 ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que :

(i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la sclérose en plaques, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii).

34. Procédé selon la revendication 33, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes et les cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains sont choisies parmi les lymphocytes T.

35. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que :

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de

culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

36. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'on met en évidence l'activité superantigénique selon un protocole tel que décrit dans les revendications 10 à 12 en utilisant un ligand ou une amplification associée à une électrophorèse.

37. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que

(i) on produit ou synthétise un polypeptide, en particulier une protéine recombinante, telle qu'identifiée en SEQ ID NO :2, ou un fragment dudit polypeptide ou de ladite protéine,

(ii) on met en contact ledit polypeptide ou ladite protéine avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii).

38. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que :

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

5 (ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec un polypeptide ou une protéine recombinante, telle qu'identifiée en SEQ ID NO :2, ou un fragment dudit polypeptide ou de ladite protéine, et

10 (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

39. Procédé selon la revendication 38, caractérisé en ce que on utilise un polypeptide, tel que défini dans les revendications 28 à 30.

15

40. Procédé selon la revendication 37 ou 38, caractérisé en ce que ledit polypeptide est codé par un acide nucléique, tel que défini dans les revendications 26 à 27 ou un vecteur selon la revendication 31.

20

41. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

25 i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune, en particulier la SEP, ou de cellules d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées PLI-2 et LM7PC,

30 ii) on met en contact ledit surnageant ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains en

présence dudit agent ou de ladite composition à des doses prédéterminées, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution
5 des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la
10 revendication 12.

42. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

15 i) on produit ou synthétise un polypeptide, en particulier une protéine recombinante,

(ii) on met en contact ledit polypeptide ou protéine recombinante avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains en présence
20 dudit agent ou de ladite composition à des doses prédéterminées, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s
25 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

43. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la SEP et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant de patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes, les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 20 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

25 44. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou

suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la SEP et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant de patients ou d'individus sains avec un polypeptide ou une protéine recombinante, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

45. Procédé selon l'une quelconque des revendications 41 à 44, caractérisé en ce que les cellules proviennent d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, en particulier de sclérose en plaques.

20

46. Procédé selon l'une quelconque des revendications 41 à 45, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

25

47. Procédé d'évaluation de l'efficacité prophylactique et/ou thérapeutique d'un agent ou d'une composition vis-à-vis d'un état pathologique, et/ou d'une prédisposition à un état pathologique, caractérisé en ce que l'on met en évidence une inhibition d'une activité

superantigénique dans un échantillon biologique comme décrit dans les revendications 41 à 46.

48. Procédé selon la revendication 47, caractérisé en ce que
5 l'on met en évidence l'inhibition de la perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et de la co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s 7 et 17.

49. Procédé selon la revendication 46, caractérisé en ce que
10 l'on met en évidence l'inhibition de l'expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et de la co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s 3 et 12.

50. Procédé selon l'une des revendications de 48 et 49,
15 caractérisé en ce que les cellules proviennent d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

51. Procédé selon les revendications 48 à 50, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de
20 SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

52. Procédé d'évaluation de l'efficacité prophylactique et/ou thérapeutique d'un agent ou d'une composition vis-à-vis d'un état pathologique, et/ou d'une prédisposition à un état pathologique, caractérisé
25 en ce que l'on met en évidence une inhibition d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique comme décrit dans les revendications 48 à 51.

53. Composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique,
30 caractérisée en ce qu'elle comprend, entre autres, un agent thérapeutique

capable d'inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, telle que définie dans les revendications 41 à 52, éventuellement en association avec un excipient et/ou un adjuvant et/ou un diluant pharmaceutiquement acceptables.

5

54. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique est un agent antiviral, plus particulièrement antirétroviral, en particulier humain, de préférence anti-MSRV1 tel qu'un inhibiteur du cycle de réplication et/ou de l'expression d'un rétrovirus, tel 10 qu'un anticorps anti-protéine rétrovirale, en particulier anti-enveloppe, tel que des oligonucléotides anti-sens, plus particulièrement bloquant l'expression rétrovirale.

55. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce 15 que l'agent thérapeutique est choisi parmi une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante, ou un fragment desdites molécules, dont la séquence protéique correspond à la séquence des molécules V β s16 et/ou 17, de préférence V β 16, éventuellement en association avec une ou des molécules naturelles et/ou recombinantes ou un fragment desdites 20 molécules dont la séquence protéique correspond à la séquence des molécules V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement des molécules V β s 3 et 12.

56. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce 25 que l'agent thérapeutique est choisi parmi une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante, ou un fragment desdites molécules, dont la séquence protéique correspond à la séquence de la molécule V β 16 et/ou 17, éventuellement en association avec une ou des molécules naturelles et/ou recombinantes ou un fragment desdites molécules dont la séquence

protéique correspond à la séquences des molécules V β s 7, 14 et 17 et préférentiellement des molécules V β s 7 et 17.

5 57. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique est choisi parmi les molécules naturelles, et/ou recombinantes et/ou de synthèse ou un fragment desdites molécules qui codent pour les molécules telles que définies dans les revendications 53 à 56.

10 58. Composition selon la revendication 57, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi les gènes thérapeutiques comprenant des molécules ADN et/ou ARN.

15 59. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi les oligonucléotides anti-sens et les oligonucléotides anti-gènes.

20 60. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi au moins un ligand susceptible d'interagir avec les V β s 16 et/ou 17, en particulier le V β 16, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement les V β s 3 et 12.

25 61. Composition selon la revendication 60, caractérisée en ce que le ligand est susceptible d'interagir avec un rétrovirus, en particulier un rétrovirus humain, tel que MSRV-1, ses protéines et/ou ses acides nucléiques.

62. Composition selon la revendication 60, caractérisée en ce que le ligand est un agent antiviral, plus particulièrement antirétroviral, en particulier humain, de préférence anti-MSRV1 tel qu'un inhibiteur du cycle de réPLICATION et/ou de l'expression d'un rétrovirus, tel qu'un anticorps anti-protéine rétrovirale, en particulier anti-enveloppe, tel que des oligonucléotides anti-sens, plus particulièrement bloquant l'expression rétrovirale.

10 63. Composition selon la revendication 60, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s.

15 64. Composition selon la revendication 61, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps anti-MSRV-1, de préférence les anticorps monoclonaux.

20 65. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi au moins un ligand susceptible d'interagir avec le V β 16 et/ou 17, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 7, 14 et 17 et 22 et préférentiellement les V β s 7 et 17.

25 66. Composition selon la revendication 60, caractérisée en ce que le ligand est susceptible d'interagir avec un rétrovirus, en particulier un rétrovirus humain, tel que MSRV-1, ses protéines et/ou ses acides nucléiques.

67. Composition selon la revendication 63 ou 65, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s.

5 68. Composition selon la revendication 63 ou 64, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps anti-MSRV-1, de préférence les anticorps monoclonaux.

10 69. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est un agent susceptible de bloquer l'interaction du superantigène aux cellules présentatrices d'antigène.

15 70. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins une molécule dont la séquence protéique correspond à la séquence codant pour 20 les molécules telles que définies dans les revendications 1 à 5, 10, 20 à 31 et 53 à 59, en particulier une molécule ADN et/ou ARN.

25 71. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins un ligand tel que défini dans les revendications 60 à 69, en particulier une molécule ADN et/ou ARN.

72. Utilisation d'une composition telle que définie dans les revendications 53 à 71, pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une pathologie, en particulier une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

5

73. Procédé pour identifier des substances capable de bloquer la transcription et/ou la traduction d'un rétrovirus humain, en particulier un rétrovirus endogène, tel que défini dans les revendications 23 et 24, et présentant une activité superantigénique, ladite activité superantigénique étant associée à une maladie auto-immune selon lequel,

on met en contact la substance avec des cellules exprimant un polypeptide rétroviral tel que défini dans les revendications 28 à 30 et ayant une activité superantigénique, et

on détecte une perte ou diminution de l'activité superantigénique comme décrit dans les revendications 1 à 6.

74. Kit pour le criblage de substances capables de bloquer l'activité superantigénique d'un rétrovirus, en particulier un rétrovirus humain endogène, associée à une maladie auto-immune, ou capable de bloquer la transcription et/ou la traduction dudit rétrovirus, comprenant :

des cellules exprimant à leur surface des produits du MHC de classe II, transformées avec et exprimant fonctionnellement un superantigène rétroviral,

des cellules porteuses de chaînes du récepteur d'un V β ou de V β s stimulées par le superantigène rétroviral, et

des moyens pour détecter une perte ou diminution de l'activité superantigénique comme décrit dans les revendications 1 à 6.

75. Utilisation de substances capables d'inhiber une fonction d'un rétrovirus humain, en particulier un rétrovirus endogène pour la

préparation d'un médicament pour une utilisation en thérapie et/ou prévention d'une maladie auto-immune associée à un superantigène rétroviral, en particulier associée à la SEP.

5

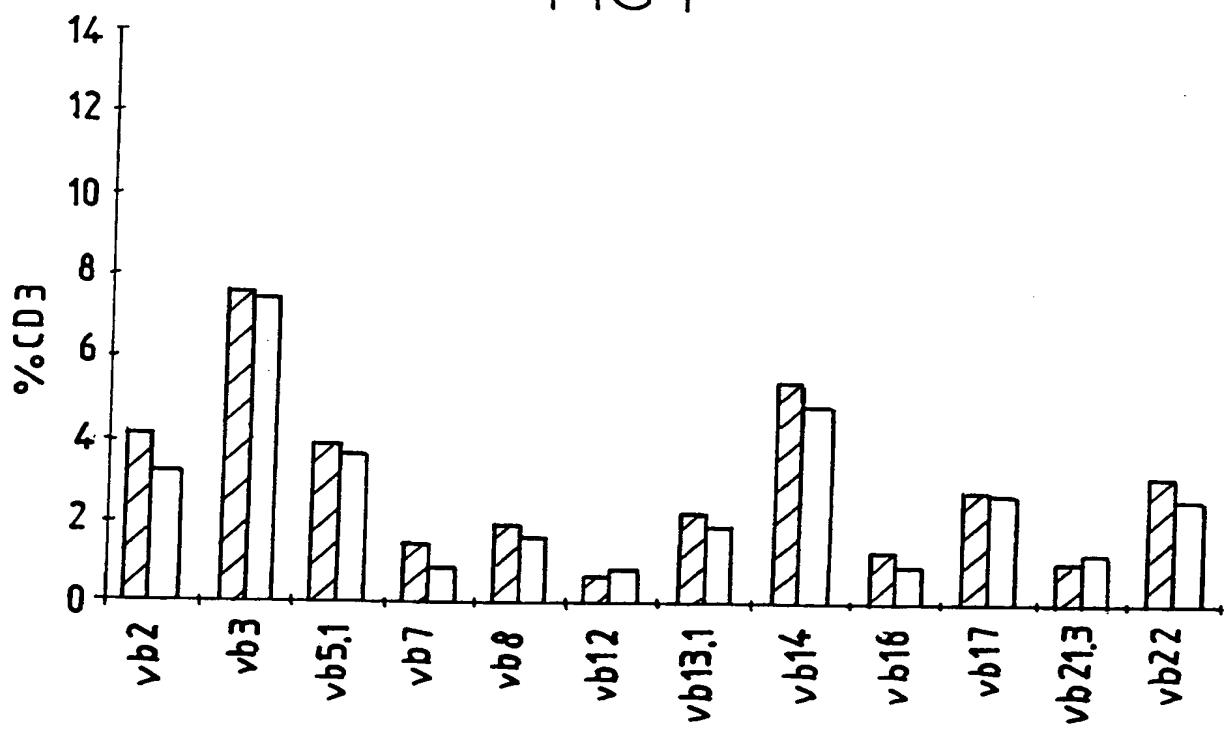
76. Utilisation selon la revendication 75, dans laquelle la substance est l'AZT ou la DDI.

10

77. Utilisation de substances capables d'inhiber la fonction de superantigène d'un rétrovirus humain, en particulier un rétrovirus endogène, pour la préparation d'un médicament pour une utilisation dans la thérapie d'une maladie auto-immune associée au superantigène rétroviral, en particulier associée à la SEP.

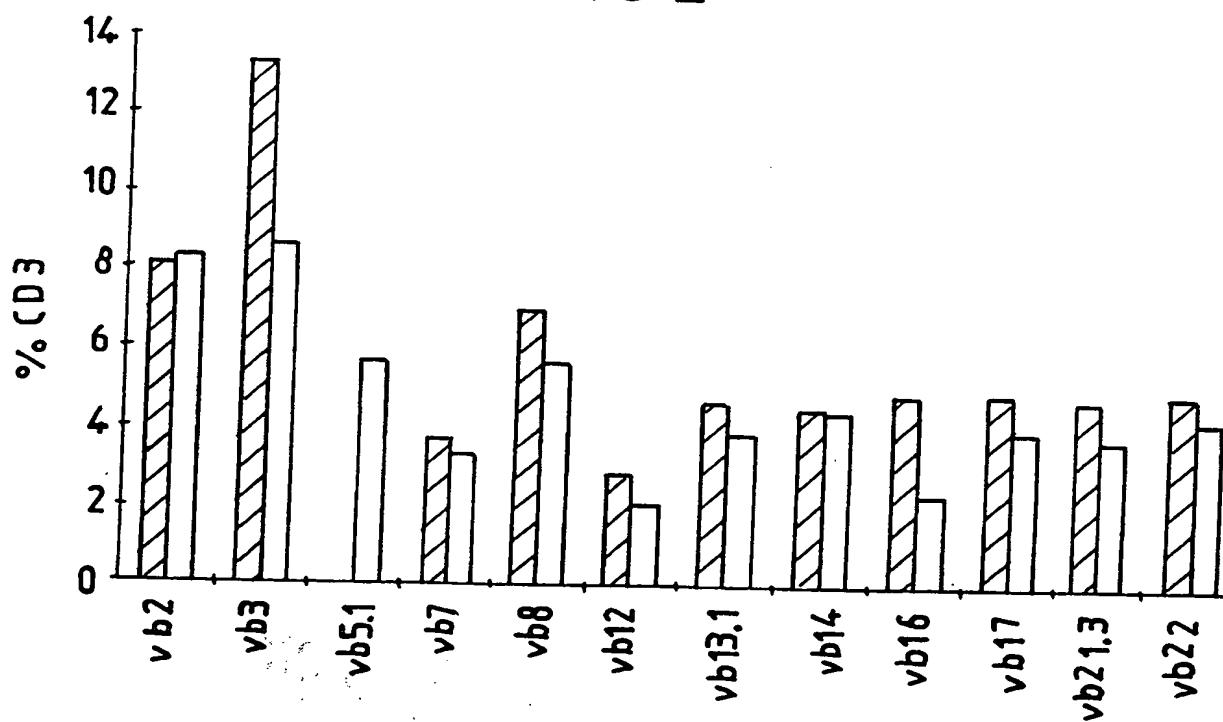
This Page Blank (uspto)

FIG 1



This Page Blank (uspi)

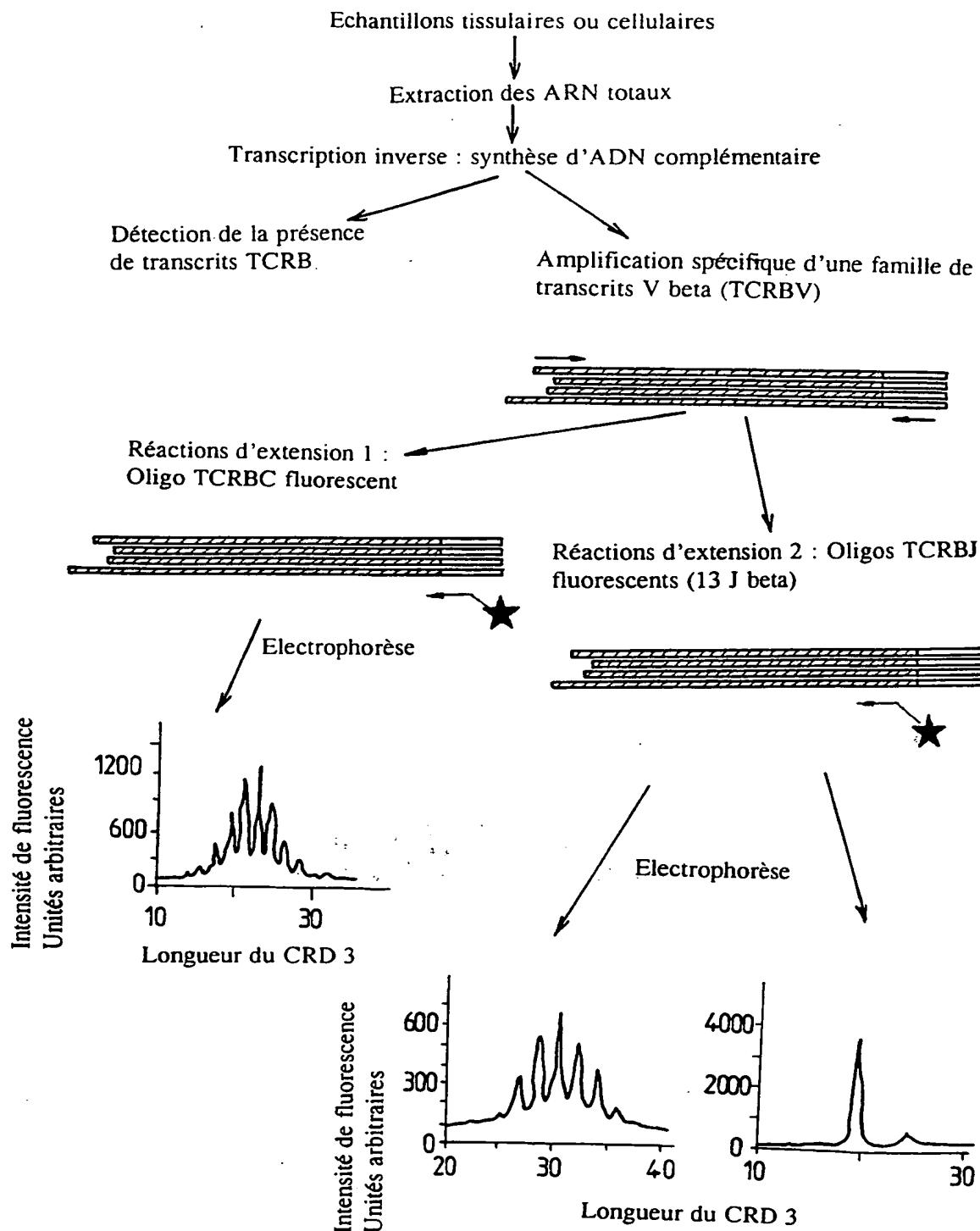
FIG 2



This Page Blank (uspto)

FIG 3

Méthode générale



This Page Blank (uspto)

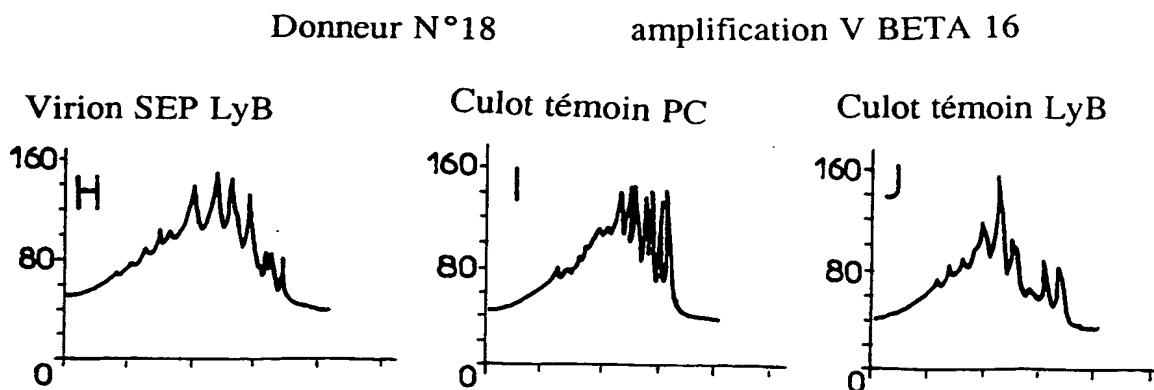
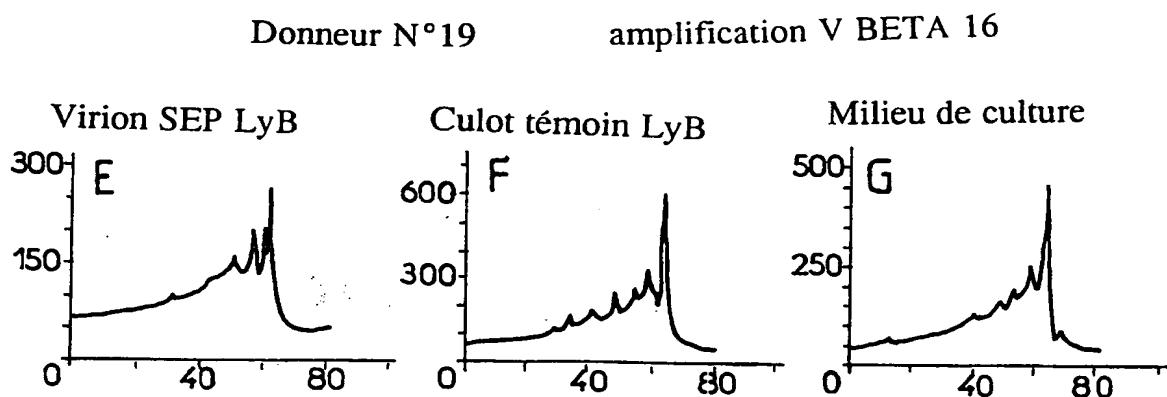
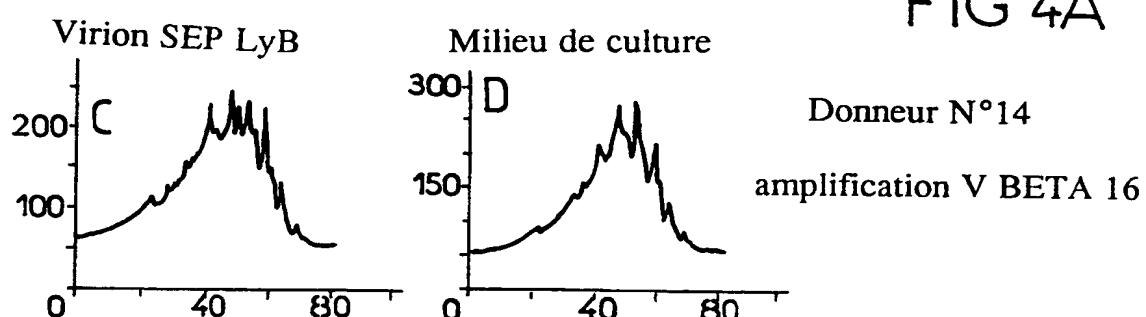
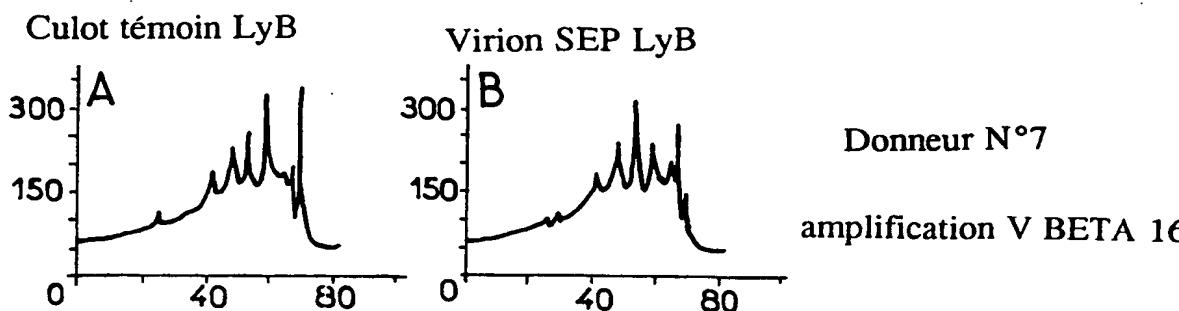


FIG 4A

This Page Blank (uspto)

Donneur N° 19 amplification V BETA 17

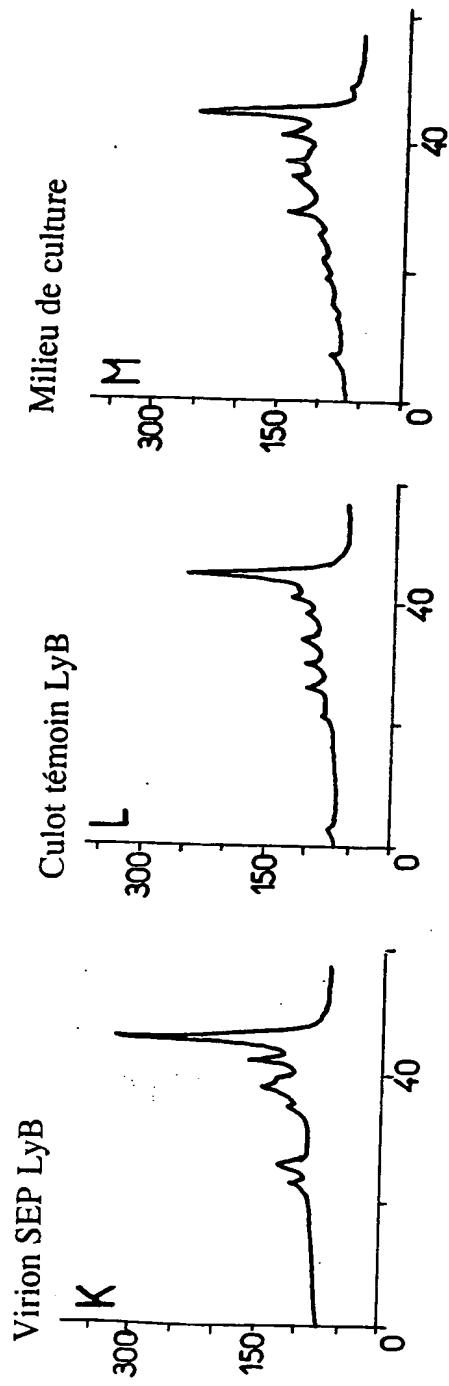


FIG 4B

This Page Blank (uspto)

LISTE DE SEQUENCES

<110> BIO MERIEUX

<120> Procédé de détection d'une activité superantigénique
dans un échantillon et composition thérapeutique ou
prophylactique

<130> SEP21-SAg

<140>

<141>

<150> FR-9903622

<151> 1999-03-19

<150> FR-9913755

<151> 1999-10-28

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1629

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggccctcc cttatcatac ttttctcttt actgttctct taccccttt cgctctcact 60
gcacccccc catgctgctg tacaaccagt agctccccctt accaagagtt tctatggaga 120
acgcggcttc ctggaaatat tgatgccccca tcataatagga gtttatctaa ggaaactcc 180
accttcactg cccacaccca tatgccccgc aactgctata actctgccac tctttgcatt 240
catgcaaata ctcattattt gacaggaaaa atgattaatc ctatgttcc tggaggactt 300
ggagccactg tctgttggac ttacttcacc cataccagta tgtctgtatgg ggggttggatt 360
caaggtcagg caagagaaaa acaagtaaag gaagcaatct cccaaactgac cccggggacat 420
agcaccccta gcccctacaa aggacttagt ctctcaaaac tacatgaaac cctccgttacc 480
cataactcgcc tggtgagcct atttaataacc accctcactc ggctccatga ggtctcagcc 540
caaaaacctta ctaactgttg gatgtgcctc cccctgcact tcagggccata catttcaatc 600
cctgttcctg aacaatggaa caacttcagc acagaaataa acaccacttc cggttttagta 660
ggacctcttg tttccaatct gggaaataacc catacctcaa acctcacctg tgtaaaattt 720
agcaataacta tagacacaaac cagctcccaa tgcacatcagg gggtaacacc tcccacacga 780
atagtctgcc taccctcagg aatattttt gtctgtggta cctcagccta tcattgtttg 840
aatggctctt cagaatctat gtgcttcctc tcattcttag tgccccctat gaccatctac 900
actgaacaag atttatacaa tcatgtcgta cctaagcccc acaacaaaag agtacccatt 960
cttccttttg ttatcagagc aggagtgcta ggcagactag gtactggcat tggcagtatc 1020
acaacctcta ctcagttcta ctacaaacta tctcaagaaa taaatggtga catggaacag 1080
gtcaactgact ccctggtcac cttgcaagat caacttaact ccctagcagc agtagtcctt 1140

This Page Blank (uspto).

caaaaatcgaa gagctttaga cttgctaacc gccaaaagag ggggaacctg tttattttta 1200
 ggagaagaac gctgttatta tgtaatcaa tccagaattg tcactgagaa agttaaagaa 1260
 attcgagatc gaataacaatg tagagcagag gagctcaaa acaccgaacg ctggggcctc 1320
 ctcagccaat ggatgccctg gactctccc ttcttaggac ctctagcagc tataatattt 1380
 ttactcctct ttggaccctg tatcttcaac ttccctgtta agtttgctc ttccagaattt 1440
 gaagctgtaa agctacaat agtttctcaa atgaaacccc agatgcagtc catgactaaa 1500
 atctaccgtg gaccctgga ccggcctgct agactatgct ctgatgttaa tgacattgaa 1560
 gtcacccctc ccgaggaaat ctcaactgca caaccctac tacactccaa ttcaactgtagga 1620
 agcagttag 1629

<210> 2
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ala Leu Pro Tyr His Thr Phe Leu Phe Thr Val Leu Leu Pro Pro
 1 5 10 15

Phe Ala Leu Thr Ala Pro Pro Pro Cys Cys Cys Thr Thr Ser Ser Ser
 20 25 30

Pro Tyr Gln Glu Phe Leu Trp Arg Thr Arg Leu Pro Gly Asn Ile Asp
 35 40 45

Ala Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Gly Asn Ser Thr Phe Thr Ala
 50 55 60

His Thr His Met Pro Arg Asn Cys Tyr Asn Ser Ala Thr Leu Cys Met
 65 70 75 80

His Ala Asn Thr His Tyr Trp Thr Gly Lys Met Ile Asn Pro Ser Cys
 85 90 95

Pro Gly Gly Leu Gly Ala Thr Val Cys Trp Thr Tyr Phe Thr His Thr
 100 105 110

Ser Met Ser Asp Gly Gly Ile Gln Gly Gln Ala Arg Glu Lys Gln
 115 120 125

Val Lys Glu Ala Ile Ser Gln Leu Thr Arg Gly His Ser Thr Pro Ser
 130 135 140

Pro Tyr Lys Gly Leu Val Leu Ser Lys Leu His Glu Thr Leu Arg Thr
 145 150 155 160

His Thr Arg Leu Val Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu Thr Arg Leu His

This Page Blank (uspto)

165

170

175

Glu Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Asn Cys Trp Met Cys Leu Pro Leu
180 185 190

His Phe Arg Pro Tyr Ile Ser Ile Pro Val Pro Glu Gln Trp Asn Asn
195 200 205

Phe Ser Thr Glu Ile Asn Thr Thr Ser Val Leu Val Gly Pro Leu Val
210 215 220

Ser Asn Leu Glu Ile Thr His Thr Ser Asn Leu Thr Cys Val Lys Phe
225 230 235 240

Ser Asn Thr Ile Asp Thr Thr Ser Ser Gln Cys Ile Arg Trp Val Thr
245 250 255

Pro Pro Thr Arg Ile Val Cys Leu Pro Ser Gly Ile Phe Phe Val Cys
260 265 270

Gly Thr Ser Ala Tyr His Cys Leu Asn Gly Ser Ser Glu Ser Met Cys
275 280 285

Phe Leu Ser Phe Leu Val Pro Pro Met Thr Ile Tyr Thr Glu Gln Asp
290 295 300

Leu Tyr Asn His Val Val Pro Lys Pro His Asn Lys Arg Val Pro Ile
305 310 315 320

Leu Pro Phe Val Ile Arg Ala Gly Val Leu Gly Arg Leu Gly Thr Gly
325 330 335

Ile Gly Ser Ile Thr Thr Ser Thr Gln Phe Tyr Tyr Lys Leu Ser Gln
340 345 350

Glu Ile Asn Gly Asp Met Glu Gln Val Thr Asp Ser Leu Val Thr Leu
355 360 365

Gln Asp Gln Leu Asn Ser Leu Ala Ala Val Val Leu Gln Asn Arg Arg
370 375 380

Ala Leu Asp Leu Leu Thr Ala Lys Arg Gly Gly Thr Cys Leu Phe Leu
385 390 395 400

Gly Glu Glu Arg Cys Tyr Tyr Val Asn Gln Ser Arg Ile Val Thr Glu
405 410 415

Lys Val Lys Glu Ile Arg Asp Arg Ile Gln Cys Arg Ala Glu Glu Leu

This Page Blank (uspto)

420

425

430

Gln Asn Thr Glu Arg Trp Gly Leu Leu Ser Gln Trp Met Pro Trp Thr
435 440 445

Leu Pro Phe Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ile Phe Leu Leu Leu Phe
450 455 460

Gly Pro Cys Ile Phe Asn Phe Leu Val Lys Phe Val Ser Ser Arg Ile
465 470 475 480

Glu Ala Val Lys Leu Gln Ile Val Leu Gln Met Glu Pro Gln Met Gln
485 490 495

Ser Met Thr Lys Ile Tyr Arg Gly Pro Leu Asp Arg Pro Ala Arg Leu
500 505 510

Cys Ser Asp Val Asn Asp Ile Glu Val Thr Pro Pro Glu Glu Ile Ser
515 520 525

Thr Ala Gln Pro Leu Leu His Ser Asn Ser Val Gly Ser Ser
530 535 540

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	G01N33/569	G01N33/68	G01N33/50	G01N33/564	G01N33/566
	G01N33/574	A61K39/00			

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199800529131, abrégé XP002139048 & H. PERRON ET AL. : "Retrovirus, cytotoxic molecules including superantigen and multiple sclerosis: Epiphénomène ou nouvelle avenue de recherche" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, vol. 90, no. 1, 23 August 1998 (1998-08-23), page 68 Montreal Canada</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	23-31

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 June 2000

Date of mailing of the international search report

26/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 00/00691	
---	--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199699194041, abrégé XP002139428 & B.A. TORRES ET AL.: "HIV encodes for its own CD4 T-cell superantigen mitogen " BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 225, no. 2, 1996, pages 672-678, New York NY USA ----	53-71
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 7, 16 August 1993 (1993-08-16) Columbus, Ohio, US; abstract no. 69990, XP002123380 abstract & E. JOUVIN-MARCHE ET AL.: "Identification of endogenous superantigens reacting with T cell receptor of V.beta.17 chains" EOS RIV IMMUNOL IMMUNOFARMACOL, vol. 13, no. 1, 1993, pages 74-75, Paris ----	1-77
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 21, 22 November 1993 (1993-11-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 223499, XP002123381 abstract & N. LABRECQUE ET AL.: "T-cell recognition of superantigens: another view." RES IMMUNOL, vol. 144, no. 3, 1993, Montreal ----	1-77
A	WO 98 26747 A (D. S. TERMAN) 25 June 1998 (1998-06-25) claims 1,20 -----	1-77

Continuation of Box I.2

Although Claim 72 concerns a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out on the basis of the effects attributed to the composition.

Continuation of Box I.1

Claim no.: 72

PCT Rule 39.1 (iv) – Method for therapeutic treatment of the human or animal body.

Continuation of Box I.2

Claims no.: 53-68, 70 , 71

Claims 53-68, 70 and 71 of the present application concern a very wide variety of compositions (cf. composition characterised in that it comprises an agent for inhibiting a superantigen activity, such as defined in Claims 41 to 52). However, a support basis as defined by PCT Article 6 or a disclosure as defined by PCT Article 5 can only be found for a very limited number of said claimed compositions. In the present case, the claims are so lacking in support basis and the disclosure of the invention in the description is so limited that it is not possible to carry out any significant search covering the entire scope. Consequently, the search was limited to the parts of the claims which exhibit a support basis and a disclosure, that is those parts concerning compositions (cf. composition characterised in that it comprises an agent for inhibiting a superantigen activity).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1 (e)). The applicant is advised that the guideline adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter unless a search has been carried out thereon. This position will remain unchanged, notwithstanding that the claims have or have not been modified, either after receiving the search report, or during any procedure under Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/00691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9826747	A 25-06-1998	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la recherche internationale No
PCT/FR 00/00691

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/569 G01N33/68 G01N33/50 G01N33/564 G01N33/566 GO1N33/574 A61K39/00											
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB											
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N A61K											
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche											
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)											
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Catégorie</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">no. des revendications visées</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199800529131, abrégé XP002139048 & H. PERRON ET AL. : "Retrovirus, cytotoxic molecules including superantigen and multiple sclerosis: Epiphénomène or new avenue of research" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, vol. 90, no. 1, 23 août 1998 (1998-08-23), page 68 Montreal Canada --- -/-/ </td> <td style="padding: 2px; text-align: center;">23-31</td> </tr> </tbody> </table>						Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées	X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199800529131, abrégé XP002139048 & H. PERRON ET AL. : "Retrovirus, cytotoxic molecules including superantigen and multiple sclerosis: Epiphénomène or new avenue of research" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, vol. 90, no. 1, 23 août 1998 (1998-08-23), page 68 Montreal Canada --- -/-/	23-31
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées									
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199800529131, abrégé XP002139048 & H. PERRON ET AL. : "Retrovirus, cytotoxic molecules including superantigen and multiple sclerosis: Epiphénomène or new avenue of research" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, vol. 90, no. 1, 23 août 1998 (1998-08-23), page 68 Montreal Canada --- -/-/	23-31									
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents			<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe								
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée											
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention											
"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément											
"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier											
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets											
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale								
6 juin 2000			26/06/2000								
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016			Fonctionnaire autorisé Van Bohemen, C								

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. .de Internationale No
PCT/FR 00/00691

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS Philadelphia PA USA; abstrcat no. PREV199699194041, abrégé XP002139428</p> <p>& B.A. TORRES ET AL.: "HIV encodes for its own CD4 T-cell superantigen mitogen " BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 225, no. 2, 1996, pages 672-678, New York NY USA</p> <p>---</p>	53-71
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 7, 16 août 1993 (1993-08-16) Columbus, Ohio, US; abstract no. 69990, XP002123380</p> <p>abrégé</p> <p>& E. JOUVIN-MARCHE ET AL.: "Identification of endogenous superantigens reacting with T cell receptor of V.beta.17 chains" EOS RIV IMMUNOL IMMUNOFARMACOL, vol. 13, no. 1, 1993, pages 74-75, Paris</p> <p>---</p>	1-77
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 21, 22 novembre 1993 (1993-11-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 223499, XP002123381</p> <p>abrégé</p> <p>& N. LABRECQUE ET AL.: "T-cell recognition of superantigens: another view." RES IMMUNOL, vol. 144, no. 3, 1993, Montreal</p> <p>---</p>	1-77
A	<p>WO 98 26747 A (D. S. TERMAN) 25 juin 1998 (1998-06-25)</p> <p>revendications 1,20</p> <p>-----</p>	1-77

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/FR 00 00691

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICIES SUR PCT/SA/ 210

Suite du cadre I.1

Bien que la revendication 72 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés à la composition.

Suite du cadre I.1

Revendications nos.: 72

Règle 39.1(iv) PCT - Méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 53-68, 70, 71

Les revendications 53-68, 70 et 71 présentes ont trait à une très grande variété de compositions (cf. composition caractérisée en ce qu'elle comprend un agent d'inhiber une activité superantigénique, telle que définie dans les revendications 41 à 52). Un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces compositions revendiquées. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux compositions (cf. composition caractérisée en ce qu'elle comprend un agent d'inhiber une activité superantigénique).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Ref. No Internationale
PCT/FR 00/00691

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9826747 A	25-06-1998	AUCUN	

DETECTION D'UNE ACTIVITE SUPERANTIGENIQUE DANS UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE

5 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de
10 la moelle épinière.

Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillets myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une prolifération 15 d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.
20

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se 25 développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des 30 astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds

astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothélique capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

5 Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus lésionnel.

10 L'étiologie de la SEP est la source d'un débat d'actualité parce que la maladie pourrait avoir des causes multiples. Des arguments ont été avancés en faveur d'une hypothèse bactérienne, virale ou auto-immune.

15 Les rétrovirus sont des candidats potentiellement intéressants pour l'étude étiologique de la sclérose en plaques, par analogie avec une maladie ovine très proche de la SEP, induite chez le mouton par un rétrovirus exogène : le virus MAEDI-VISNA. L'infection expérimentale de moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la génèse de l'infection démyélinisante du mouton.

20 De nombreux travaux ont été réalisés pour étayer l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie et la découverte que HTLV-1, un oncovirus, est associé à une myéopathie chronique et progressive, la Paraparésie Spastique Tropicale (PST), a relancé l'intérêt pour les virus, sans qu'il ait pu être établi un lien de causalité entre virus et sclérose en plaques.

25 Récemment, les travaux de H. Perron et al. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561 ; " Current Concepts in Multiple Sclerosis " Wiethöler et al., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, 111-116 et the Lancet 1991 ; 337, 862-863) ont permis à partir d'une ponction lombaire de liquide céphalo-rachidien d'un patient SEP d'isoler une lignée non immortalisée de cellules

non lymphoïdes et de mettre en évidence la présence d'un virus, présentant les caractéristiques d'un rétrovirus et montrant en particulier un pic correspondant à une activité transcriptase inverse, dans le surnageant de culture de cette lignée. Plus récemment encore, ces mêmes auteurs ont 5 obtenu à partir de ce pic d'activité transcriptase inverse un ADN complémentaire qui correspondait au gène *pol* codant pour l'enzyme RT (transcriptase inverse ou reverse transcriptase). Ce rétrovirus, appelé MSRV par les auteurs, a notamment été caractérisé au niveau génomique dans la demande de brevet PCT WO 99/02666. L'analyse phylogénique, par 10 comparaison de la séquence de la région *pol* de MSRV avec d'autres séquences *pol* disponibles dans les bases de données a permis de montrer que MSRV est proche de la famille ERV-9 (endogenous retrovirus-9).

Par ailleurs, F. Beseme et al. dans la demande de brevet PCT WO 99/02696 ont criblé une banque d'ADNc à l'aide d'une sonde Ppol- 15 MSRV et détecté des clones chevauchants qui leur ont permis de reconstruire un ARN génomique putatif de 7582 nucléotides. Cet ARN génomique présente une structure R-U5-gag-pol-env-U3-R caractéristique des rétrovirus et une interrogation de plusieurs bases de données a permis de montrer qu'il existe une quantité importante de séquences génomiques 20 (ADN) apparentées dans le génome humain qui sont retrouvées sur plusieurs chromosomes. Les auteurs ont ainsi mis en évidence l'existence de structures partielles de type rétroviral dans le génome humain et envisagé leur rôle potentiel dans des maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques. Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes a été 25 dénommée HERV-W, en raison de ses caractéristiques structurelles. L'analyse phylogénique dans la région *pol* a montré que la famille HERV-W est phylogéniquement proche des familles ERV-9 et RTVL-H et appartient donc à la famille des rétrovirus endogènes de type I. Par ailleurs, l'analyse phylogénique de la trame de lecture ouverte de *env* montre qu'elle est plus 30 proche des rétrovirus simiens de type D et des rétrovirus de la

réticuloendothéliose aviaire que des rétrovirus mammifères de type C, suggérant une structure de génome chimérique C/D. Les analyses des arbres phylogéniques montrent que les familles ERV-9 et HERV-W dérivent de deux vagues d'insertion indépendantes.

5 La protéine de l'enveloppe de MSRV-1 codée par le gène *env* de MSRV-1 et ses variants présente une très forte homologie avec la protéine *env* de HERV-W codée par l'ARN exprimé dans le placenta humain tel que décrit dans la demande de brevet WO-99/02696 au nom de la Demanderesse.

10 Le rétrovirus MSRV est génétiquement apparenté à la famille HERV-W.

Les variants de MSRV-1 ont un gène *env* qui présente avantageusement une homologie d'au moins 90%, de préférence au moins 95%, voire de 98% avec celui de MSRV-1.

15 Tous ces éléments plaident en faveur de l'implication d'éléments rétroviraux dans la sclérose en plaques.

Il semble, par ailleurs, maintenant probable que des manifestations auto-immunes peuvent être induites par l'expression de superantigènes (SAGs).

20 Les superantigènes sont des molécules susceptibles de se lier à des molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et à des séquences peptidiques caractéristiques de certaines familles de récepteurs des cellules T ($V\beta$). Ces superantigènes activent un grand nombre de clones T, indépendamment du peptide antigénique reconnu par leur TCR (récepteur des cellules T) en association avec le CMH de la cellule présentatrice d'antigènes. La conséquence de cette activation est une prolifération polyclonale ou une induction d'anergie, voire d'apoptose, dans la population lymphocytaire T porteuse de ce $V\beta$. Les superantigènes sont 25 des produits d'expression de micro-organismes, tels que bactéries et 30 rétrovirus exogènes ou endogènes.

Certaines molécules ayant des propriétés proches de certains effets connus pour les superantigènes peuvent aussi être responsables de processus immunopathologiques majeurs et sont appelées superantigènes-like. Dans la suite de la présente description, ils sont inclus dans le terme 5 superantigène.

Le récepteur T (TCR) présent à la surface des lymphocytes et impliqué dans la reconnaissance d'un antigène ou d'un superantigène est constitué de deux chaînes, une chaîne α de 40 à 50 kDa et une chaîne β de 10 35 à 47 kDa, liées entre elles par un pont disulfure. Chaque chaîne polypeptidique comprend deux domaines d'environ 110 acides aminés chacun, qui sont organisés comme les domaines des immunoglobulines. Ils sont ancrés dans la membrane plasmique par un peptide transmembranaire et possèdent une courte queue cytoplasmique. La différence de poids moléculaire entre les deux chaînes α et β est due à la présence d'une 15 chaîne carbohydrate en position N-terminale de la chaîne α . La variabilité de séquence en acides aminés réside dans le domaine N-terminal de chaque polypeptide α et β , homologues des domaines variables des immunoglobulines. Chaque domaine est codé par un réarrangement de gènes V, D et J pour la chaîne β et V et J pour la chaîne α . L'analyse des 20 séquences de ces différents domaines TCR V révèle une grande variabilité qui correspond aux régions hypervariables des immunoglobulines (CDRs). (Roitt I. et al., Immunology 3rd edition, Mosby, England).

Le réarrangement des gènes du TCR est similaire à celui des gènes des immunoglobulines. La diversité des TCRs provient d'une 25 recombinaison génétique entre les segments V, D et J. Les gènes $V\beta$ s, incluant les gènes D, J et C, sont groupés ensemble à l'exception de $V\beta$ 14 qui est présent à l'extrémité 3' du locus. Une diversité extensive est générée pendant les procédés de regroupement des régions V-D-J, mais aussi V-J et V-D-D-J.

Un superantigène est capable d'activer les lymphocytes T de façon non spécifique, contrairement à un antigène. Un superantigène est capable de se fixer conjointement aux molécules du CMHII présentes à la surface des cellules présentatrices de l'antigène et aux molécules V β s du récepteur T présent à la surface des cellules T. La chaîne V β du TCR fixe le superantigène à l'extérieur du site spécifique d'antigène du TCR, mais cela est suffisant pour activer la cellule T. Cette fixation entraîne une induction de signaux intracellulaires dans la cellule T. Ces cascades de signaux intracellulaires induisent soit la prolifération de la cellule T portant le V β d'intérêt, soit une anergie ou une apoptose de la cellule. Ainsi, en fonction des conditions expérimentales, l'effet sur la sous population des lymphocytes T activée peut être un effet de prolifération, d'anergie ou d'apoptose polyclonale. Contrairement à une réponse T à un antigène classique, la stimulation des lymphocytes T est donc polyclonale et non oligoclonale, voire monoclonale (Scherer et al., 1993 Annu. Rev. Cell Biology 9 : 101-128). Cette induction de prolifération cellulaire, d'anergie ou d'apoptose dépend de plusieurs paramètres qui agissent en combinaison. Elle dépend en particulier de la concentration du superantigène et de l'existence de rencontres préalables de stimulations analogues ciblant le même V β par le système immunitaire du donneur de lymphocytes T. La mise en anergie ou en apoptose peut suivre entre autre une stimulation ou activation prolongée des cellules T. Ainsi un superantigène a un effet induisant une variation positive ou négative d'une sous-population de cellules T d'un V β " x " défini. Un superantigène ciblant un déterminant antigénique V β " x " donné va interagir avec toute la sous-population lymphocytaire portant ce V β . L'effet induit par cette interaction couplée avec celle ciblant le CMHII des cellules présentatrices de l'antigène (APCs) est une variation significative du pourcentage des lymphocytes V β " x " par rapport aux autres lymphocytes T V β non " x ". Cette variation est typiquement soit une prolifération, soit une déplétion (Bernal A

et al., 1999 J Clin Immunol 19 : 149 ; Li H et al., 1999 Annu Rev Immunol 17 : 435 ; Grgis et al., 1999 J Exp Med 189 : 265 ; Lavoie et al., Immunol Rev 1999 168 : 257 ; Cornwell WD et Ringers TJ, Immunology 1999 96 : 193 ; Wang ZQ et al., Immunology 1998 94 : 331 ; Maier CC et al., PNAS 1998 95 : 4499 ; Michie CA et Cohen J, Trends Microbiol 1998 6 : 61 ; La Bon A et al., Int Immunol 1999 11 : 373 ; Shen X et Konig R, Int Immunol 1998 10 : 247 ; Noble A et al., J Immunol 1998 160 : 559 ; Yang Y et al., Int Immunol 1998 10 : 175 ; Renno T et al., J Immunol 1999 162 : 6312 ; Roitt I et al., Immunology third edition, Mosby).

Par ailleurs, lorsque l'agent codant pour un superantigène donné est mis en présence de lymphocytes T, et non seulement en présence de la molécule purifiée portant l'activité superantigénique, l'effet immunologique résultant correspond à la superposition d'un effet superantigénique et de stimulations antigéniques variées causées par les autres antigènes de l'agent entier. Il est à noter que, contrairement à la stimulation superantigénique, ces dernières peuvent différer en fonction du HLA de classe II du donneur de lymphocytes ou du patient dans un contexte pathologique. Ceci a pour conséquence que la prolifération ou la déplétion T V β " x " s'accompagne d'un profil de réactivité (prolifération ou inhibition) d'autres sous populations V β s non " x ", éventuellement variables selon le HLA II ; ce profil étant défini par la nature des antigènes associés à l'agent ou à plusieurs agents (dans le cas d'une cascade conduisant à l'activation d'un rétrovirus endogène codant pour le superantigène exprimé dans ces conditions). Dans ce dernier cas, deux superantigènes peuvent être exprimés, si l'agent inducteur en produit un et si l'infection d'une cellule cible par celui ci réactive un rétrovirus endogène qui en produit alors un second. Ces données confirment donc la nécessité d'évaluer un profil complet de réponse T en fonction du V β lorsque l'on étudie un contexte " naturel " d'infection/réactivation et non une molécule superantigénique purifiée hors contexte.

La Demanderesse a maintenant montré que l'expression d'un superantigène ou d'une protéine ayant certains effets de type superantigène (superantigène-like) est associée à un état pathologique, par exemple un état associé à la sclérose en plaques.

5 L'activité superantigénique est induite directement ou indirectement par un agent effecteur, tel qu'une protéine ou un micro-organisme ou un agent pathogène, en particulier un rétrovirus (MSRV-1) et/ou un agent pathogène (MSRV-2), et en particulier un épitope compris dans une protéine env d'un rétrovirus MSRV-1.

10 De plus, la Demanderesse a également mis en évidence une production stimulée de cytokines, telles que l'IL-6, dans des cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains et mises en contact avec un extrait de surnageant ou une fraction d'un extrait de surnageant de culture cellulaire SEP.

15 La demanderesse a aussi mis en évidence un profil de réponse T, en fonction des V β s à un ou des agent(s) associé(s) à l'expression d'une molécule de type superantigénique.

20 Enfin, la Demanderesse a observé que les mêmes extraits provenant de patients SEP et/ou infectés par le rétrovirus MSRV-1 induisait une mort par apoptose significativement élevée dans les mêmes cellules mononucléées sanguines.

La Demanderesse a donc développé un procédé pour mettre en évidence les effets précités dans un échantillon biologique.

25 Les critères requis pour établir qu'une protéine ou qu'un micro-organisme est ou contient un superantigène ou une protéine ayant certains effets de type superantigène sont :

(i) la capacité de la protéine ou du micro-organisme à induire l'expansion ou la perte de certaines familles de lymphocytes porteuses au niveau de leur TCR d'une chaîne V β particulière, et

(ii) une activation des V β s indépendante de l'haplotype du CMH de classe II.

Il convient de noter que lorsque l'on parle d'activité superantigénique dans la présente invention, ceci signifie indifféremment 5 l'expression d'un superantigène ou d'une protéine ayant certains effets de type superantigène (SAg-like).

L'invention concerne un procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique, selon lequel on met en 10 évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17, préférentiellement V β 16.

Selon une variante avantageuse, on met en évidence un profil 15 d'une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et d'une co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, et préférentiellement des V β s 3 et 12.

L'invention concerne aussi un procédé de détection d'une activité superantigénique selon lequel on met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17.

Selon une variante avantageuse, on met en évidence une perte 20 majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et une co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence des V β s 7, 14, et 17, et avantageusement des V β s 7 et 17.

La détection de l'expansion et éventuellement de la co-expansion ou de la perte et éventuellement co-diminution est effectuée par 25 mise en évidence des molécules V β s membranaires associées aux cellules mononucléées sanguines, qui de préférence sont les lymphocytes T. On calcule ensuite un pourcentage de variation des molécules V β s détectées et provenant de tout ou partie du surnageant de culture de patients atteints 30 de SEP par rapport au nombre de molécules V β s détectées dans tout ou

partie d'un surnageant de culture provenant d'un donneur sain. Il est également possible de prévoir un mélange de surnageants de culture provenant de donneurs sains.

L'ensemble des molécules V β s est appelé répertoire V β des lymphocytes T. Les différentes molécules V β s sont détectées de manière spécifique par utilisation d'au moins une des techniques décrites ci-dessous :

(a) soit par utilisation d'au moins un ligand, c'est à dire toute molécule capable de reconnaître spécifiquement le V β à détecter, par exemple un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-V β ou un fragment d'anticorps monoclonal ou polyclonal ou une molécule inhibitrice de la fonction du V β considéré. Le pourcentage des molécules V β s du répertoire est alors rapporté au pourcentage des cellules présentant la molécule CD3 à leur surface, cette dernière étant aussi détectée de manière spécifique par l'utilisation d'au moins un ligand. Par ligand, on entend notamment un anticorps monoclonal ou polyclonal ou un fragment desdits anticorps, de préférence un anticorps monoclonal. Les anticorps monoclonaux dirigés contre un V β d'intérêt sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface. Des souris ou des lapins sont immunisés (i) soit avec une protéine naturelle ou recombinante, (ii) soit avec un peptide immunogène, (iii) soit avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène peut être également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des V β s d'intérêt. Les protéines ou peptides sont couplés à l'hémocyanine de Lymphet Keyhole (peptide-KLH), comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine sérique humaine (peptide-HSA). Les animaux sont soumis à une injection de peptide -KLH ou de peptide -HSA en utilisant de l'adjuvant complet de Freund (IFA). Les sérums et les surnageants de

culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide sont analysés pour la présence d'anticorps par un test ELISA utilisant les molécules initiales. Les cellules spléniques de ces souris sont récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est 5 l'agent de fusion le plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel 10 que soit le mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprécipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur 15 rendement. Un nombre suffisant d'anticorps est ciblé dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la molécule d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de la molécule d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de "CDR grafting" (protocole réalisé par de nombreuses 20 compagnies, sous forme de service). Ces anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères humanisés ou non, produits par génie génétique, dans des cellules 25 eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention ;

(b) soit par biologie moléculaire après extraction des acides nucléiques des cellules mononucléées sanguines, entre autres les lymphocytes T, mises en présence de surnageant ou d'une fraction de 30 surnageant de culture SEP et en présence d'une culture de surnageant ou

d'une fraction de surnageant de culture témoin, amplification de leurs ARN V β transcrits par RT-PCR, étude du profil des produits d'amplification sur gel et/ou séquençage et/ou électrophorèse. Pour l'étape de RT-PCR et/ou pour détecter de façon spécifique les produits d'amplification, on utilise des 5 fragments d'ADN et/ou d'ARN codant pour le déterminant V β étudié ou pour un fragment de ce déterminant, et/ou des fragments d'ADN et/ou d'ARN capables de s'hybrider et d'amplifier des fragments d'acides nucléiques codant pour le déterminant V β étudié par complémentarité des bases nucléiques. Le profil des fragments amplifiés dont la taille varie en 10 fonction du réarrangement des chaînes spécifiques de chaque clone est déterminé par analyse électrophorétique et permet d'objectiver une polyclonalité. La détection des fragments amplifiés d'ADN et/ou d'ARN codant pour le déterminant V β étudié peut aussi être réalisée par hybridation nucléotidique selon les techniques bien connues de l'homme de 15 l'art (Southern Blot, Northern Blot, ELOSA "Enzyme-Linked Oligosorbent Assay" (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res. 1993 Dec ; 54 (12) : 2021-6 et François Mallet et al., Journal of Clinical Microbiology, June 1993, p1444-1449)).

Aussi, la présente invention a pour objet un procédé avantageux 20 pour mettre en évidence l'activité superantigénique précitée qui comprend les étapes suivantes :

(i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une 25 maladie auto-immune, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

5 (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii).

En particulier les patients atteints de maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer le maladie sont des patients SEP
10 et les cellules mononucléées sanguines productrices de molécules superantigéniques et provenant de patients atteints de SEP sont notamment choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

Les cellules mononucléées sanguines répondant à la stimulation et provenant de donneurs sains sont notamment choisies parmi les
15 lymphocytes T.

Un autre procédé avantageux de l'invention consiste à

(i) prélever des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-
20 immune et d'individus sains,

(ii) mettre en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les
25 cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest,.et

(iii) détecter ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

En particulier, les cellules proviennent de patients atteints de 5 sclérose en plaques ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie ou dérivent de culture de cellules issues de patients SEP.

La mise en évidence de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou de ladite perte et éventuellement co-diminution est réalisée

(a) soit par utilisation de ligands, en particulier un anticorps et 10 de préférence un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence des V β s 16, 3 et 12, ou d'un ligand en particulier un anticorps et de préférence un anticorps monoclonal, chaque 15 ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence les V β s 16, 7, 14 et 17,

(b) soit selon le protocole décrit ci-dessous en réalisant :

(i) une extraction des ARN totaux des cellules mononucléées sanguines mises en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture SEP et en présence de surnageant ou d'une fraction 20 de surnageant de culture témoin,

(ii) une transcription inverse desdits ARN,

(iii) une amplification spécifique de chaque famille de V β s à l'aide d'un couple d'amorces déterminé,

25 (iv) un marquage par tout marqueur approprié des produits d'amplification obtenus,

(v) une électrophorèse desdits produits d'amplification et analyse des profils d'électrophorèse obtenus, à l'aide d'un détecteur approprié.

La prédisposition à un état pathologique est évaluée en testant 30 expérimentalement la sensibilisation immunologique d'un patient en

mettant en évidence une expansion ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou 17 et éventuellement une co-expression ou une co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β 2 , 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 5 22, et préférentiellement des V β s 3 et 12 ou des V β s 7, 14 et 17, de préférence 7 et 17.

La prédisposition détectée peut être une prédisposition naturelle ou une prédisposition acquise, par exemple après une forte stimulation chez un individu des lymphocytes T porteurs des déterminants V β 16 ou V β 17, 10 préférentiellement V β 16, par exposition de l'organisme de l'individu à un antigène. Cet antigène peut être par exemple au moins une protéine ou un peptide du virus de l'Hépatite B.

Aussi, la présente invention a pour objet un procédé de détection d'une pathologie ou d'une prédisposition à une pathologie selon 15 lequel :

on met en évidence une expansion ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17, préférentiellement V β 16 ou expansion ou perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et une co-expansion ou co-diminution de 20 lymphocytes porteurs de V β s des lymphocytes T choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, et préférentiellement les V β s 3 et 12 ou les V β s 7, 14 et 17, de préférence 7 et 17,

on calcule un pourcentage de variation du nombre des V β s détectées chez un patient atteint de SEP par rapport à celui obtenu avec les 25 lymphocytes T d'un donneur sain, dans des conditions telles que déterminées précédemment.

Si le pourcentage de variation, en valeur absolue, est significativement différent de 0, on peut en déduire que le patient présente une prédisposition pour la maladie SEP et/ou développe la maladie. Si ce 30 pourcentage est en valeur absolue égal à 0, cela peut signifier que le

donneur ne présente pas de prédisposition pour la maladie SEP et/ou n'a pas développé la maladie, au moment auquel le procédé a été appliqué.

L'invention a également pour objet, un procédé de détection d'un état pathologique ou d'une prédisposition à un état pathologique, dans 5 un échantillon biologique, selon lequel on met en évidence au moins l'un des paramètres suivants :

une activité superantigénique, telle que définie précédemment,
une stimulation de la production de cytokines, telles que l'IL-6,
une induction d'apoptose cellulaire.

10 De préférence, on détecte au moins deux des paramètres en association, en particulier on détecte une activité superantigénique et une induction d'apoptose ou une activité superantigénique et une stimulation de la production de cytokines.

15 De manière encore plus avantageuse, l'on détecte les trois paramètres en association.

L'état pathologique est en particulier associé à une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

20 L'activité superantigénique détectée selon les procédés de l'invention peut notamment être induite directement ou indirectement par un agent effecteur choisi parmi les protéines, les microorganismes, les agents pathogènes et par exemple les bactéries et/ou les rétrovirus, de préférence les rétrovirus humains, tels que MSRV-1 et/ou les agents pathogènes tels que MSRV-2.

25 En particulier, l'activité superantigénique est induite par la protéine d'enveloppe de MSRV-1 référencée en SEQ ID NO :2 ou par un fragment de ladite protéine, ou bien par le gène *env* de MSRV-1 référencée en SEQ ID NO :1 ou un fragment dudit gène.

L'invention concerne aussi :

- Un rétrovirus humain, en particulier rétrovirus endogène, ayant 30 une activité superantigénique et étant associé à une maladie auto-immune,

selon lequel le rétrovirus est MSRV-1 et l'activité superantigénique est induite par l'expression du gène *env* de MSRV-1 ou d'un fragment dudit gène, en particulier un fragment dudit gène codant pour au moins un cadre de lecture de la protéine *env* de MSRV-1 (SEQ ID NO :2) ou bien elle est 5 induite par la protéine *env* de MSRV-1 ou par un fragment de ladite protéine, en particulier par un fragment correspondant à au moins un cadre de lecture de ladite protéine (SEQ ID NO :2).

- Une molécule d'acide nucléique comprenant au moins un fragment ou des fragments de l'ARN ou de l'ADN du gène *env* de MSRV-1, 10 identifié par SEQ ID NO :1, ledit fragment ayant une longueur d'au moins 18 nucléotides et de préférence d'au moins 24 nucléotides ; notamment elle comprend au moins un fragment codant pour au moins un cadre de lecture et contenant éventuellement un codon stop ; cette molécule pouvant coder pour une activité superantigénique.

15 - une molécule polypeptidique, en particulier protéine ou fragment de protéine comprenant au moins un fragment ou des fragments de ladite protéine *env* de MSRV-1 identifiée par SEQ ID NO :2, ledit fragment ayant une longueur d'au moins 6 acides aminés et de préférence d'au moins 8 acides aminés ; avantageusement la molécule polypeptidique 20 comprend au moins un cadre de lecture, et possède éventuellement une activité superantigénique.

- un vecteur comprenant des molécules d'acides nucléiques telles que définies ci-dessus.

L'invention concerne aussi un procédé de détection d'une 25 activité superantigénique dans un échantillon biologique de patients atteints de sclérose en plaques, selon lequel on met en évidence une expansion majoritaire ou une perte significative de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7. A cette fin, on peut procéder comme suit :

(i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées 30 sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules

leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993,
5 sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs
10 sains, et

15 (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii), comme décrit précédemment par utilisation d'un ligand ou par une amplification associée à une electrophorèse ;

ou

20 (i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

25 (ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

L'invention concerne aussi un procédé de détection d'une activité superantigénique de l'invention, selon lequel

(i) on produit ou synthétise un polypeptide, en particulier une protéine recombinante, telle qu'identifiée par SEQ ID NO :2, ou un fragment dudit polypeptide ou de ladite protéine,

(ii) on met en contact ledit polypeptide ou ladite protéine avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii).

Ou bien selon lequel

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec un polypeptide ou une protéine recombinante, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

De préférence, on utilise un polypeptide de l'invention tel que défini précédemment. Avantageusement, il est codé par un acide nucléique de l'invention, tel que défini précédemment ou par un vecteur de l'invention tel que défini précédemment.

Les procédés tels que définis précédemment peuvent être utilisés pour le suivi thérapeutique de patients et/ou l'évaluation de l'efficacité de molécules à usage thérapeutique vis à vis de paramètres identifiés.

5 Pour évaluer l'efficacité de molécules à usage thérapeutique, c'est à dire une ou des molécule(s) susceptible(s) d'inhiber l'expansion ou la perte des lymphocytes T d'un V β déterminé on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de
10 patients atteints d'une maladie auto-immune, en particulier de SEP,

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la SEP et d'individus sains,

15 (ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant de patients SEP ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes, les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que
20 les cellules des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit précédemment ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit ci dessus.

On calcule ainsi un pourcentage de variation du nombre des V β s détectés en présence de la molécule ou des molécules à usage thérapeutique et en l'absence d'une telle ou de telles molécule(s).

La molécule ou les molécules à usage thérapeutique sont également testée(s) *in vivo* selon un procédé qui consiste

à utiliser un surnageant de culture de cellules mononucléées, de préférence les lymphocytes B et les monocytes, ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules étant isolées à partir d'un échantillon biologique d'un patient atteint de SEP, ou à utiliser le surnageant d'une lignée cellulaire établie, telle que la lignée cellulaire PLI-2 et la lignée cellulaire LM7PC ou à utiliser tout ou partie d'au moins une molécule obtenue à partir d'au moins un des deux surnageants précités,

à mettre en contact tout ou partie d'au moins l'un des surnageants précités ou au moins une molécule contenue dans l'un au moins d'entre eux, avec une culture de cellules mononucléées sanguines, de préférence des lymphocytes T, prélevées chez un individu et/ou un animal avant et après administration de la ou des molécules à tester, et parallèlement après administration d'un agent et/ou composition placebo chez un patient SEP et chez un animal,

à mettre en évidence, comme décrit ci-dessus, l'expansion ou la perte des lymphocytes ayant le déterminant V β , avant et après l'administration de la molécule ou des molécules à usage thérapeutique ou de l'agent et/ou composition placebo, chez l'individu et/ou l'animal,

à détecter ladite expansion et éventuellement une co-expansion et/ou la perte et éventuellement une co-diminution des lymphocytes T exprimant à leur surface une molécule V β donnée par utilisation d'au moins un ligand ou par biologie moléculaire comme décrit précédemment, et

à calculer un pourcentage (X) d'expansion ou de perte de déterminants V β détectées dans les cellules mononucléées mises en culture et issues de l'individu ou de l'animal ayant reçu une ou plusieurs

administrations de la molécule ou des molécules à tester par rapport au nombre de déterminants V β détectés dans les cellules mises en culture et issues de l'individu ou de l'animal n'ayant reçu aucune administration et/ou un pourcentage (Y) d'expansion ou de perte de déterminants V β détectées
5 dans les cellules mononucléées mises en culture et issues de l'individu ou de l'animal ayant reçu une ou plusieurs administrations de la molécule ou des molécules à tester par rapport au nombre de déterminants V β détectés dans les cellules mises en culture et issues du patient ou de l'animal ayant reçu une ou des administration de molécule(s) et/ou d'une composition ou
10 d'un agent placebo en respectant les mêmes conditions d'administration que celle utilisées pour la ou les molécules à évaluer.

Si |X| et/ou |Y| et/ou |X| + |Y| sont significativement différents de 0, cela peut signifier que la molécule ou les molécules inhibent totalement ou partiellement l'expansion ou la perte de cellules
15 mononucléées avec le déterminant V β considéré; si |X| ou |Y| ou |X| + |Y| sont égaux ou proches de 0, cela peut signifier que l'agent n'inhibe pas totalement ou que partiellement l'expansion ou la perte de cellules mononucléées avec le déterminant V β considéré.

On entend par agent et/ou composition placebo, tout agent
20 et/ou composition qui n'entraîne pas une diminution des cellules mononucléées sanguines ayant le déterminant V β déterminé.

L'invention concerne aussi un procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, comprenant les étapes
25 suivantes :

(i) on produit ou synthétise un polypeptide, en particulier une protéine recombinante telle qu'identifiée par SEQ ID NO :2, ou un fragment dudit polypeptide ou de ladite protéine,

(ii) on met en contact ledit polypeptide ou protéine
30 recombinante avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de

cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses prédéterminées, et

5 (iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit précédemment.

10 L'invention a également pour objet, un procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent et/ou d'une composition thérapeutique(s) dans un échantillon biologique, ou après administration à un patient ou un animal, vis-à-vis d'un état pathologique. Selon ce procédé on met en évidence une inhibition ou une diminution d'une activité superantigénique, telle que définie précédemment.

15 L'efficacité thérapeutique d'un agent est déterminée en estimant l'inhibition ou la diminution de l'activité superantigénique qui est elle-même déterminée par l'inhibition de l'expansion et/ou la diminution ou par l'inhibition et/ou la diminution des lymphocytes T porteurs de V β s 20 déterminés.

Pour ce faire :

(i) on prélève un surnageant de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant 25 de patients atteints d'une maladie auto-immune, en particulier la SEP, ou de cellules d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées PLI-2 et LM7PC,

(ii) on met en contact ledit surnageant de culture avec une série de cultures de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs

sains en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses prédéterminées, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution
5 des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit précédemment, ou
10 (i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints de maladie auto-immune, en particulier des patients SEP, et d'individus sains,
(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant de patients et d'individus sains avec des surnageants de culture
15 ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC, et
(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement
20 co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16,
25 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit précédemment ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit précédemment.

L'efficacité thérapeutique de plusieurs agents et/ou compositions peut être évaluée en combinaison dans un même essai.

Un procédé *in vivo* avantageux pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique dans la sclérose en plaques comprend les étapes suivantes :

on détermine les pourcentages X et Y comme décrit et défini ci-dessus. X et Y sont déterminés après administration d'un agent et/ou composition à évaluer dans un patient atteint de la SEP,

on détermine de même X' et Y'; ils sont déterminés comme X et Y respectivement, mais après administration du même composé dans un individu sain,

on calcule les pourcentages x et y, avec $x = X/X'$ et $y = Y/Y'$. Ces pourcentages reflètent la diminution du nombre de cellules mononucléées sanguines présentant le déterminant V β due à l'administration du composé thérapeutique à tester chez un patient atteint de sclérose en plaques par rapport à un individu sain.

Si |x| et/ ou |y| et/ou |x| + |y| sont significativement différents de 0, cela peut signifier que l'agent et/ou la composition testés à un effet thérapeutique vis-à-vis de la pathologie SEP ; Si |x| et/ou |y| et/ou |x| + |y| sont égaux ou proches de 0, cela peut signifier que l'agent et/ou la composition testés n'a pas ou très peu d'effet thérapeutique vis-à-vis de la pathologie SEP.

Un autre procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, comprend les étapes suivantes :

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la SEP et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant de patients ou d'individus sains avec un polypeptide ou une

protéine recombinante, de préférence telle qu'identifiée par SEQ ID NO :2, ou un fragment dudit polypeptide ou de ladite protéine, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution

5 à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par

10 utilisation d'un ligand ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit précédemment.

De préférence, les cellules proviennent d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, en particulier de sclérose en plaques et/ou les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP

15 sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

L'invention a encore pour objet une composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique qui comprend, entre autres, un agent thérapeutique capable d'inhiber, directement ou indirectement, une activité superantigénique dans un échantillon biologique, telle que définie précédemment, éventuellement en association avec un véhicule et/ou un excipient et/ou un adjuvant et/ou un diluant pharmaceutiquement acceptables, c'est à dire qui permettent l'administration à l'animal et à l'être humain. Toutes ces données font partie des connaissances générales de l'homme du métier. (voir par exemple Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed. 1980, Mack Publishing Co). Le véhicule pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et présente une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que de l'eau stérile, libre d'agents

20

25

30

pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

On entend par efficacité thérapeutique le bénéfice clinique et biologique acquis après administration d'un agent thérapeutique en vue d'une amélioration, voire d'une guérison de la maladie. Ce bénéfice se traduit entre autre par une diminution des signes cliniques, biologiques et des effets pathologiques de la maladie après une analyse clinique par le médecin et/ou des analyses biologiques, telles que l'imagerie par résonance magnétique, analyse des bandes oligoclonales dans liquide céphalorachidien, analyse de potentiels... Cette diminution de signes cliniques et effets pathologiques doit entraîner un bénéfice pour le patient (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion). La maladie étudiée de préférence est la sclérose en plaques. Ces agents thérapeutiques sont capables (i) d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative l'activité superantigénique telle que décrite dans la présente invention et/ou (ii) de moduler et/ou d'inhiber l'expression des déterminants V β s identifiés dans la présente invention. Différents agents thérapeutiques sont produits en suivant des approches classiques largement décrites dans la littérature. Les différents groupes d'agents thérapeutiques envisageables dans la présente invention sont décrits ci-dessous.

Comme défini précédemment, l'agent thérapeutique est capable d'inhiber ou de diminuer, directement ou indirectement, une activité superantigénique, telle que définie dans la présente invention, pour un ou des V β s déterminés et/ou pour un ou des rétrovirus MSRV. L'agent thérapeutique consiste en un matériel chimique ou biologique ou en une composition qui présente une efficacité thérapeutique qui peut être mise en évidence selon les modalités décrites précédemment.

Pour la simplicité de l'exposé, on parlera généralement de molécules d'intérêt de l'invention aussi bien pour désigner le ou les différents V β s associé(s) à l'activité superantigénique, que pour désigner les protéines de MSRV-1, en particulier la protéine env de MSRV-1.

5

Par agent thérapeutique on entend :

- au moins une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie de la séquence des molécules d'intérêt, c'est à dire :
 - au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante et/ou un polypeptide de synthèse choisi parmi les molécules d'intérêt de l'invention,
 - au moins un fragment naturel et/ou synthétique de ces molécules d'intérêt, par exemple un fragment immunogène capable d'induire une réponse immune contre un polypeptide issu d'au moins une des molécules d'intérêt de l'invention,
 - au moins un peptide mimotope défini à partir des séquences des molécules d'intérêt de l'invention, ou une combinaison de mimotopes, capable d'induire une réponse immune contre un polypeptide issu d'au moins une des molécules d'intérêt de l'invention,
- 20 - au moins une protéine ou un peptide pouvant réguler *in vivo* la transcription et/ou la traduction des molécules d'intérêt de l'invention et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences.

La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humorale), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les lymphocytes T "helper", notamment les lymphocytes T CD4+ (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponse se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur

forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules impliquées dans la présentation des antigènes (APC). 1) Selon un premier aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T "helper"), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-lia 1997, Annu Rev Immunol 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines, la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). 2) Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les lymphocytes de type CD8+ (CTL) sont activés a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMHI, et b) éventuellement par les cytokines produites par les CD4+.

A partir de la séquence en acides aminés des molécules d'intérêt de l'invention, des séquences peptidiques de ces molécules ou des fragments de séquences peptidiques de ces molécules, correspondant à tout ou partie de la séquence primaire de ces molécules et peuvent être synthétisés par des méthodes classiques de synthèse peptidique ou obtenus par recombinaison génétique.

Des protéines recombinantes correspondantes aux molécules d'intérêt de l'invention, produites dans un système cellulaire procaryote ou

eucaryote, peuvent être produite par l'homme du métier à partir de la connaissance des séquences des gènes correspondants décrits dans la littérature et en tenant compte de la dégénérescence du code génétique. Toutes les séquences protéiques identifiées dans la présente invention sont 5 ainsi susceptibles d'être obtenues par recombinaison génétique. Les gènes sont clonés dans des vecteurs adaptés. Des vecteurs différents sont utilisés pour transformer des cellules procaryotes (par exemple *E. coli*) et des cellules eucaryotes (par exemple cellules COS, CHO et cellules Simliki). Les protéines recombinantes correspondant aux molécules d'intérêt de 10 l'invention ou à des fragments de ces protéines peuvent être ainsi produits dans des systèmes cellulaires procaryotes et/ou eucaryotes. Dans les cellules *E. coli*, les protéines recombinantes sont produites avec une queue poly-histidine. La fraction protéique insoluble est solubilisée dans de l'urée 8M. L'enrichissement du produit est effectué sur résine chélatée au nickel 15 (Qiagen). La colonne est lavée avec des concentrations décroissantes d'urée. L'élution est réalisée avec de l'imidazole en l'absence d'urée. La séquence complète des molécules d'intérêt de l'invention peut être également clonée dans un plasmide adapté puis transférée dans le virus de la vaccine pour obtenir un virus recombinant ;

20 - au moins un ligand spécifique d'au moins une desdites molécules d'intérêt de l'invention ou de leurs fragments qui est capable de se fixer aux molécules d'intérêt ou aux récepteurs desdites molécules d'intérêt ou encore d'interférer pour la liaison de la molécule d'intérêt à la cellule présentatrice d'antigène et d'inhiber l'activité superantigénique,

25 c'est à dire :

- au moins un anticorps ou fragment d'anticorps polyclonal ou monoclonal spécifique d'au moins une desdites molécules d'intérêt de l'invention ou de leurs fragments. Cet anticorps peut être ou non neutralisant, c'est-à-dire capable ou non d'inhiber l'activité de la protéine 30 d'intérêt. Le ligand peut être choisi parmi toute molécule ou fragment de

molécule capable de se fixer aux molécules d'intérêt, par exemple des récepteurs, des co-facteurs de ces molécules, des anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer aux molécules d'intérêt ou à tout fragment.

5 Ces anticorps sont très utiles notamment pour permettre la mise en œuvre de compositions thérapeutiques car ils conduisent par exemple, à des réactions immunes, dirigées spécifiquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. On administre chez le patient soit des anticorps solubles
10 neutralisants pour inhiber leur fonction, soit des anticorps solubles spécifiques pour éliminer le peptide par formation de complexes immuns. L'invention décrit l'utilisation d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement au moins une molécule d'intérêt décrite dans la présente invention pour le traitement et /ou pour le suivi thérapeutique de maladie,
15 de préférence la sclérose en plaques. Ces anticorps sont polyclonaux et de préférence monoclonaux. De préférence ces anticorps inhibe la fonction de la protéine en se fixant. La capacité de l'anticorps à se fixer spécifiquement à la protéine est analysée par des techniques conventionnelle décrites, comme par exemple par des tests ELISA ou de Western Blot en utilisant la
20 molécule ou le peptide immunogène naturel ou synthétique. Le titre de l'anticorps est alors déterminé. La capacité de l'anticorps à neutraliser la fonction de la protéine peut être analysée par différents moyen, par exemple en déterminant la diminution de l'activité de la molécule ou du peptide immunogène en présence de l'anticorps.

25 Par exemple, les anticorps monoclonaux dirigés contre une molécule d'intérêt de l'invention ou une partie de cette molécule sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface Des souris ou des lapins sont immunisées (i) soit avec la protéine naturelle ou recombinante d'intérêt, (ii)
30 soit avec tout peptide immunogène de cette protéine d'intérêt, (iii) soit

avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène peut être également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des molécules d'intérêt.

5 Les protéines ou peptides sont couplés à l'hémocyanine de Lyphet Keyhole, en abrégé peptide-KLH, comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine de sérique humaine, en abrégé peptide-HSA. Les animaux sont soumis à une injection de peptide -KLH ou de peptide -HSA en utilisant de l'adjuvant complet de Freund (IFA). Les

10 sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide sont analysés pour la présence d'anticorps anti-molécules par un test ELISA utilisant les molécules initiales. Les cellules spléniques de ces souris sont récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est l'agent de fusion le

15 plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le

20 mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprecipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur

25 rendement. Un nombre suffisant d'anticorps anti-protéines sont ciblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la molécule d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de la molécule d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de "CDR grafting" (protocole

30 réalisé par de nombreuses compagnies, sous forme de service). Ces

anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques.

La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères humanisés ou non, 5 produits par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention,

- au moins une molécule inhibitrice de la fonction d'au moins une molécule choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments,

10 - au moins une molécule régulatrice de l'expression d'au moins une molécule choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments, par exemple pour bloquer la transcription ou la traduction de ces molécules,

15 - au moins une molécule régulatrice du métabolisme d'au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments,

20 - au moins une molécule régulatrice de l'expression et/ou du métabolisme d'un ligand d'au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments, par exemple un récepteur ou un co-facteur ;

25 - au moins une séquence d'acides nucléiques comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique dont la séquence nucléique est déduite des séquences d'ADN et d'ARN codant pour tout ou partie des molécules d'intérêt de l'invention, en association avec des éléments assurant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par la séquence nucléique du gène d'intérêt thérapeutique. Les gènes peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome 30 de la cellule cible, ou d'acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels

que la spermine. Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment pour :

- au moins pour une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, et/ou

5 - au moins pour un ligand ou toute partie d'un ligand capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, pouvant inhiber ou non la fonction de la molécule d'intérêt, et/ou

10 - au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, pouvant inhiber ou non la fonction de la molécule d'intérêt. Il peut notamment s'agir d'anticorps transmembranaire

15 natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible du mammifère génétiquement modifiée et soit capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T "helper" impliqué dans le procédé 20 d'activation d'une telle cellule, et/ou

25 - au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine ou de ses fragments, ladite protéine étant choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention, pouvant inhiber la fonction et/ou le métabolisme et/ou la fixation des molécules d'intérêt ou de leurs fragments.

Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, 30 dans le même sens ou dans le sens inverse, pour autant que la fonction de

promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée.

De même dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques " neutres " ou introns qui 5 ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (référence : demande de brevet PCT WO 94/29471).

Ledit acide nucléique peut également comprendre des 10 séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réPLICATION et/ou pour l'intégration, pour la transcription et/ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art.

Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule 15 cible, ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

La séquence d'acide nucléique est de préférence une séquence 20 d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, selon un second mode de réalisation de l'invention, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles et afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un " vecteur ", et plus particulièrement 25 sous la forme d'un vecteur viral, tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non viral tel que, par exemple, un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide nucléique complexée ou conjuguée à au moins une molécule ou 30 substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un

amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire pratique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique 5 notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acetonitrile ou leurs dérivés. La littérature procure un nombre important d'exemples de tels vecteurs viraux et non viraux.

10 De tels vecteurs peuvent en outre et de préférence comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers tels que les cellules T helpers, les cellules T cytotoxiques et les cellules présentatrices de l'antigène. Ils peuvent également permettre de 15 diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tel que le noyau, les mitochondries ou les peroxysomes, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse de compartiments intracellulaires. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la 20 littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet PCT WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de 25 peptides fusogènes, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une composition de tels composés,

ou encore

- au moins une séquence d'acides nucléiques capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les molécules 30 d'intérêt de l'invention ou leurs fragments. Les fragments correspondent en

particulier à des molécules anti-sens ou ribozyme et peuvent être synthétisés à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que ceux commercialisés par la société Applied Biosystem. Les oligonucléotides anti-sens sont capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une protéine cible d'intérêt, par inhibition de la formation et/ou du fonctionnement du polysome selon le positionnement de l'ARNm dans la cible. Donc le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une inhibition par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par des oligonucléotides anti-sens impliquent une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotide anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la cible est un site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN. Dans ce cas particulier, on parle plus précisément d'oligonucléotides antigènes. Il est bien entendu que les oligonucléotides anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des connaissances générales de l'homme de l'art. Bien entendu, de telles molécules anti-sens peuvent constituer en tant que telles des vecteurs. On peut également utiliser des vecteurs qui comprennent une séquence d'acides nucléique qui code pour un anti-sens. Ces molécules d'acides nucléiques sont capables de s'hybrider dans des conditions stringentes à l'ADN ou/et ARN codant pour les protéines de l'invention ou pour leur(s)

fragment(s). Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le Tm (" melting temperature ") de l'hybride à l'étude. De telles molécules sont synthétisées 5 et peuvent être marquées en utilisant des méthodes de marquage conventionnelles utilisées pour les sondes moléculaires, ou peuvent être utilisées comme amorces dans les réactions d'amplification. Les séquences qui présentent au moins 90% d'homologie par rapport à une séquence de référence font également partie de l'invention, de même que les fragments 10 de ces séquences qui présentent au moins 20 nucléotides et de préférence 30 nucléotides contigus homologues par rapport à une séquence de référence.

Les molécules ou séquences d'acides nucléiques ADN ou ARN consistent en un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, 15 linéaire ou circulaire, naturel et isolé ou de synthèse, correspondant à un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, et permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique choisi dans le groupe consistant en un ADNc ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager. Les séquences d'acides nucléiques sont 20 déduites de la séquence d'acides aminés des molécules d'intérêt de l'invention ou de leurs fragments, en utilisant le code génétique. En raison de la dégénérescence du code génétique l'invention englobe également des séquences équivalentes ou homologues. Ces séquences définies permettent à l'homme de l'art de définir lui-même les molécules adaptées. Il peut ainsi 25 définir et utiliser des molécules d'acides nucléiques complémentaires des séquences ADN et/ou ARN codant pour les molécules d'intérêt de l'invention ou de leur(s) fragment(s).

Ces séquences d'acides nucléiques et/ou vecteurs permettent de cibler les cellules dans lesquelles la protéine ou le fragment de protéine

est exprimé, soit par utilisation de molécule de ciblage introduite sur le vecteur, soit par l'utilisation d'une propriété particulière de la cellule ;

- au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement au moins une molécule d'intérêt de l'invention ou tout fragment de ces molécules, ou des anticorps spécifiques d'au moins une desdites molécules d'intérêt de l'invention ou de ses fragments, ladite cellule de mammifère étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique ou un fragment d'une séquence nucléique ou une association de séquences d'acides nucléiques correspondant à des fragments d'acides nucléiques issus d'un même gène ou de gènes différents, la ou lesdites séquences nucléiques étant déduite(s) des séquences d'ADN et d'ARN codant pour les molécules d'intérêt de l'invention ou tout fragment, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie de la molécule d'intérêt de l'invention, d'un fragment de la molécule ou d'un anticorps spécifique de la molécule qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de mammifère (Toes et al., 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Ainsi, ladite cellule contient au moins un gène qui code *in vivo* pour :

- au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments, et/ou

- au moins un peptide défini à partir de la séquence primaire d'au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de et/ou leurs fragments, et/ou

- au moins toute molécule inhibitrice de l'activité et/ou de la fixation et/ou de l'expression de ces molécules, et/ou

- au moins un peptide issu de la séquence primaire d'une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments, et capable de se fixer sur au moins une glycoprotéine du CMHI et/ou CMHII, et/ou

- au moins un ligand et/ou tout anticorps et/ou toute partie d'anticorps capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou les fragments.

Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du 5 mammifère à traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule cible aura subi un traitement rendant compatible avec le mammifère à traiter. Selon un aspect préféré, par "mammifère" on entend désigner un mammifère humain. Ces cellules sont établies en lignées cellulaires et sont 10 préférentiellement CMHII+ ou CMHII- inductibles comme les lymphocytes, les monocytes, les astrocytes, les oligodendrocytes.

L'invention concerne également les cellules modifiées et un procédé de préparation d'une cellule telle que décrite ci dessus caractérisé 15 en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère par tout ou moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique contenant une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule ou un fragment de molécule *in vivo*, comme décrit juste ci-dessus. Plus particulièrement, elle 20 concerne des cellules procaryotes, des cellules de levure et des cellules animales, en particulier des cellules de mammifères transformées par au moins une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tel que décrit précédemment.

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules (cellules 25 dendritiques, macrophages, astrocytes, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+) du patient ou allogéniques sont placées en contact d'une préparation purifiée du polypeptide cible, celui-ci étant internalisé, apprêté et présenté à la surface cellulaire associé aux molécules du CMHI et/ou CMHII. Elles peuvent entre autre induire une réponse immune 30 spécifique contre le peptide. Les cellules "activées" sont ensuite

administrées au patient, chez lequel elles peuvent entre autre induire une réponse immune spécifique des antigènes (on utilise une voie naturelle de la réponse immune, mais on contrôle ce que la cellule présentatrice de l'antigène va présenter)

5 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules présentatrices d'antigène (cellule dendritique, macrophage, astrocytes,...) sont modifiées *in vitro* pour exprimer les antigènes dans la cellule transformée, qui peuvent être sécrétées par la cellule et/ou s'associer aux molécules du CMHI et/ou CMHII et être présentées à la surface des cellules
10 pour induire chez le patient chez lequel on administre la cellule modifiée une réaction immune parfaitement ciblée.

Toutes les approches vaccinales ne sont pas toujours satisfaisantes et conduisent par exemple à des réactions immunes limitées dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre
15 des antigènes présentant une grande variabilité. De même la présentation incorrecte des antigènes par les glycoprotéines du système CMH à la surface des cellules, ne permet pas de développer chez le patient traité une immunité anti-protéine d'intérêt convenable. Afin de pallier ces problèmes, certains auteurs ont proposé dans le cadre de tels procédés vaccinaux, de
20 sélectionner les fragments minimaux antigéniques correspondant aux portions de peptide susceptibles d'être reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques, de les exprimer dans les cellules afin qu'ils s'associent aux molécules du CMHI et soient présentés à la surface des cellules pour induire chez le patient traité une réaction immunitaire
25 parfaitement ciblée (Toes et al. 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Plus particulièrement, il a été montré que des épitopes de très petites tailles (variant de 7 à environ 13 acides aminés) qui sont exprimés à partir de minigènes introduits dans un virus de la vaccine, pouvaient induire une immunisation de type cellulaire. Il a par ailleurs été montré que plusieurs
30 minigènes pouvaient être exprimés conjointement à partir d'un même

vecteur (cette construction particulière est appelée 'string of beads'). Une telle construction présente l'avantage d'induire une réaction immune de type CTL synergique (Whitton et al ;, 1993 J. of Virology 67 : 348-352).

Protocole de mise en contact des cellules et du fragment
5 antigénique :

La présentation des fragments antigéniques par les molécules CMHI et/ou CMHII repose sur un procédé intracellulaire identifié (voir Groettrup et al., 1996 Immunology Today 17 : 429-435 pour une revue) au cours duquel des peptides antigéniques de très courtes tailles (environ 7-13
10 acides aminés) sont produits par dégradation d'un polypeptide plus complexe contre lequel la réaction immune finale sera dirigée. Ces courts peptides sont ensuite associés aux molécules du CMHI ou du CMHII pour former un complexe protéique qui est transporté à la surface cellulaire afin de présenter lesdits peptides aux lymphocytes T cytotoxiques circulants ou
15 aux lymphocytes T helper circulants, respectivement. Il convient en outre de noter que la spécificité des molécules CMH I ou CMH II vis-à-vis des peptides antigéniques varie en fonction des molécules CMH I ou CMH II (exemple pour le CMHI : HLA-A, HLA-B, ...) et de l'allèle (exemple pour le CMH I : HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11) considérés. Au sein d'une même
20 espèce animale, d'un individu à l'autre, il existe une grande variabilité des gènes codant pour les molécules du système CMH (à ce sujet, voir notamment George et al., 1995, Immunology Today 16 : 209-212).

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes
25 T CD4+, les lymphocytes T CD8+, sont modifiées de manière à exprimer à leur surface des anticorps spécifiques du peptide ciblé. Le peptide est neutralisé par les anticorps exprimés à la surface des cellules. Ces cellules sont de préférence immunes, de préférence du patient, de préférence cytotoxiques, modifiées pour exprimer tout ou partie d'un anticorps
30 spécifique du polypeptide cible.

Isolement de cellules mononucléées à partir de sang périphérique :

En 1968, Boyum décrivit une technique rapide qui permet par centrifugation du sang sur gradient de densité, de séparer les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) avec un bon rendement (rendement théorique 50%, c'est-à-dire 10^6 cellules /ml de sang). 50 ml de sang périphérique prélevés stérilement dans des tubes héparinés sont centrifugés 20 minutes à 150g à 20°C. Les cellules récupérées sont diluées dans deux volumes de sang périphérique initial de PBS stérile. 10 ml de cette suspension sont déposés sur 3ml d'une solution de ficoll-Hypaque (milieu de séparation des lymphocytes, Flow). Après centrifugation pendant 20 minutes à 400g et 20°C sans freinage de décélération, les cellules mononucléées sédimentent à l'interface PBS-Ficoll, en une couche dense, opalescente, alors que la quasi-totalité des globules rouges et des polynucléaires sédimentent au fond du tube. Les cellules mononucléées sont récupérées et lavées en PBS stérile.

Internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

Traitements préalables des cellules présentatrices de l'antigène :
les cellules présentatrices de l'antigène sont préalablement lavées avec un tampon PBS-BSA à 0.5% (p/v) puis énumérées puis elles sont préincubées en présence de différents inhibiteurs de réduction trois fois en PBS-BSA 0.5% contenant de 10 µM à 10 mM final de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) ou de NEM (N-éthylmaléimide). Les étapes ultérieures de fixation d'antigènes à la surface cellulaire ou d'internalisation d'antigènes se réalisent aussi en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs.

Protocole d'internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

8. 10^6 cellules sont incubées en présence de quantité saturante de protéines radiomarquées à l'iode 125 (1 µg) dans des micropuits dans

70 µl. Après une heure d'incubation à 4°C sous agitation, les antigènes sont fixés à la surface des cellules. La suspension cellulaire est lavée deux fois en PBS-BSA et les culots cellulaires sont repris dans 70 µl de tampon et incubées à 37°C pendant différentes périodes allant jusqu'à 2 heures.

5 Cellules et surnageants sont séparés par centrifugation à 800g pendant 5 minutes 4°C. Pour des plus longues périodes d'incubation, l'étape préliminaire de pré-fixation des antigènes à la surface des cellules est supprimée. Les cellules sont diluées dans un milieu RPMI-10% SVF en présence de 20 mM Hépès, à 10⁶cellules /ml. Les cellules sont incubées en

10 présence d'un excès d'antigène pendant différentes périodes à 37°C (1 µg de molécules /5.10⁷ cellules monocytes/macrophages ou /10⁸ cellules B-EBV).

A partir des connaissances des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt de l'invention, il est à la portée de l'homme de l'art de

15 définir et utiliser les molécules décrites ci-dessus et/ou toute molécule capable de se fixer aux dites molécules, et/ou toute molécule capable d'inhiber l'activité desdites molécules d'intérêt.

L'agent thérapeutique est de préférence choisi parmi une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante, ou un fragment

20 desdites molécules, dont la séquence protéique correspond à la séquence des molécules V β s16 et/ou 17, de préférence V β 16, éventuellement en association avec une ou des molécules naturelles et/ou recombinantes ou un fragment desdites molécules dont la séquence protéique correspond à la séquences des molécules V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et

25 préférentiellement des molécules V β s 3 et 12 ou des molécules V β s 7, 14 et 17, et avantageusement 7 et 17 ;

parmi les molécules naturelles, et/ou recombinantes et/ou de synthèse ou un fragment desdites molécules qui codent pour les molécules telles que définies précédemment.

En particulier l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi les molécules ADN et/ou ARN ; les oligonucléotides anti-sens et les oligonucléotides anti-gènes ; au moins un ligand susceptible d'interagir avec les V β s 16 et/ou 17, en particulier le V β 16, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement les V β s 3 et 12 ; parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s ci-dessus ; au moins un ligand susceptible d'interagir avec les V β 16 et/ou 17, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 7, 14 et 17 et 22 et préférentiellement les V β s 7 et 17, en particulier les anticorps, et de préférence les anticorps monoclonaux ou des fragments desdits anticorps et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s ci-dessus ; un agent susceptible de bloquer l'interaction du superantigène aux cellules présentatrices d'antigène ; au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins une molécule dont la séquence protéique correspond à la séquence codant pour les molécules telles que définies précédemment, en particulier une molécule ADN et/ou ARN ; au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins un ligand tel que défini précédemment, en particulier une molécule ADN et/ou ARN ; et leurs utilisations pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une pathologie, en particulier une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

L'agent thérapeutique est de préférence choisi parmi une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante, ou un fragment desdites molécules, dont la séquence protéique correspond

à la séquence des protéines MSRV-1, et avantageusement à la séquence de la protéine env de MSRV-1, et

parmi les molécules naturelles et/ou recombinantes et/ou de synthèse ou un fragment desdites molécules qui codent pour les molécules telles que définies précédemment.

En particulier, l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi les molécules ADN et/ou ARN ; les oligonucléotides anti-sens et les oligonucléotides anti-gènes ; au moins un ligand susceptible d'interagir avec les protéines MSRV-1, en particulier la protéine env de MSRV-1, parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-protéines de MSRV-1 en particulier les anti-protéines env de MSRV-1 ; au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'ADN codant pour au moins une molécule dont la séquence protéique correspond à la séquence codant pour les molécules telles que définies précédemment, en particulier une molécule ADN et/ou ARN ; au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'ADN codant pour au moins un ligand tel que défini précédemment, en particulier une molécule d'ADN et/ou ARN ; et les utilisations pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une pathologie, en particulier une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

Ainsi, l'agent thérapeutique est de préférence un agent antiviral, plus particulièrement antirétroviral, en particulier humain, de préférence anti-MSRV1 tel qu'un inhibiteur du cycle de réPLICATION et/ou de l'expression d'un rétrovirus, tel qu'un anticorps anti-protéine rétrovirale, en particulier anti-enveloppe, tel que des oligonucléotides anti-sens, plus particulièrement bloquant l'expression rétrovirale.

Avantageusement, le ligand est susceptible d'interagir avec un rétrovirus, en particulier un rétrovirus humain, tel que MSRV-1, ses

protéines et/ou ses acides nucléiques. En particulier, le ligand est choisi parmi les anticorps anti-MSRV-1, de préférence les anticorps monoclonaux.

Les agents thérapeutiques tels que définis précédemment sont utilisés pour la préparation d'une composition prophylactique et/ou thérapeutique et l'invention porte également sur une telle composition comprenant au moins un desdits agents thérapeutiques en association éventuelle avec un véhicule et/ou un excipient et/ou un adjuvant et/ou un diluant pharmaceutiquement acceptable. Il peut s'agir entre autres de compositions vaccinales à base de molécules protéine(s) ou de peptide(s) ou de séquences d'acides nucléiques dérivés des molécules d'intérêt ou de leurs fragments, comme décrit précédemment pour la prophylaxie et/ou la thérapie d'une maladie auto-immune, en particulier la sclérose en plaques. Parmi ces molécules, on peut trouver des antiviraux. Ces protéines et peptides administrés sont caractérisés en ce qu'ils ne doivent pas être toxiques pour l'organisme dans lequel ils sont administrés, ou doivent avoir perdu leur capacité à se fixer à un ligand, et peuvent induire significativement une réponse immune médiée par les lymphocytes T et/ou les anticorps dirigés contre cette protéine. De telles protéines sont dites "modifiées", cependant leur immunogénicité est conservée. De telles molécules immunogéniques modifiées sont obtenues par un nombre de traitements conventionnels, par exemple la dénaturation chimique ou à la chaleur, la troncation ou la mutation avec délétion, insertion ou remplacement d'acides aminés. Un exemple de troncation consiste en la troncation d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale pouvant aller jusqu'à 5-30 acides aminés. Les molécules modifiées peuvent être obtenues par des techniques synthétiques et/ou recombinantes ou par des traitements chimiques ou physiques des molécules naturelles.

Les molécules d'intérêt naturelles et/ou recombinantes identifiées dans la présente invention et les séquences peptidiques ou les fragments desdites molécules sont utilisées en vaccination prophylactique

et thérapeutique contre les maladies, de préférence la sclérose en plaques. Un vaccin comprend une quantité immunogénique effective de la molécule immunogène en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant et/ou un diluant. Les véhicules, 5 adjuvants et diluants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence le Remington's Pharmaceutical Sciences. L'utilisation de compositions vaccinales est particulièrement avantageuse en association avec un diagnostic précoce de la maladie. La protéine immunogène est utilisée dans la préparation de 10 médicament pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique. Les protéines d'intérêt peuvent être éliminées de l'organisme sans induire d'effets secondaires indésirables. L'identification de telles molécules ou peptides vaccins est réalisée comme suit : on vérifie que les molécules candidates modifiées comme décrit précédemment (protéines naturelles, 15 recombinantes, peptides) ne sont pas toxiques pour l'organisme, puis on vérifie leur immunogénicité (i) en réalisant un test *in vitro* de prolifération de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène administré (T cell assay) ou un test *in vitro* de cytotoxicité des lymphocytes CD8+ spécifiques de l'antigène administré et (ii) en mesurant entre autre le taux d'anticorps 20 circulants dirigés contre la protéine naturelle. Ces formes modifiées sont utilisées pour immuniser des hommes par des procédures standard avec des adjuvants appropriés.

Les vaccins préparés sont injectables, c'est-à-dire en solution liquide ou en suspension. En option, la préparation peut aussi être 25 émulsifiée. La molécule antigénique peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances 30 auxiliaires comme des agents "wetting" ou émulsifiants, des agents qui

tamponnent le pH ou des adjuvants comme l'hydroxyde d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Dans le cas des peptides, leur couplage à une plus grosse molécule (KLH, toxine tétanique) augmente quelquefois l'immunogénicité. Les vaccins sont administrés 5 conventionnellement par injection par exemple sous cutanée ou intramusculaire. Des formulations additionnelles favorables avec d'autres modes d'administration incluent des suppositoires et quelquefois des formulations orales.

En général, la concentration en protéine dans la composition 10 utilisée pour une administration *in vivo* est par exemple de 0,1 μ g /ml à 20 mg /ml.

La présente invention concerne également l'utilisation de vaccins incluant des molécules d'acides nucléiques qui codent pour les molécules d'intérêt de l'invention ou des peptides immunogènes ou leur 15 fragment(s), non actifs. Les vaccins d'acides nucléiques, en particulier les vaccins ADN, sont administrés généralement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable en injection intramusculaire.

Un autre aspect de l'invention concerne des compositions prophylactiques et/ou thérapeutiques qui comprennent, entre autres, des 20 substances naturelles et/ou synthétiques et/ou recombinantes (i) capables de bloquer et/ou d'inhiber l'activité des molécules d'intérêt de l'invention et/ou de leurs fragments, et/ou (ii) capables d'inhiber leur métabolisme, et/ou (iii) capables de réguler l'expression des molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments, et/ou (iv) capables d'inhiber la fonction et/ou 25 l'expression des ligands des molécules d'intérêt de l'invention ou leurs fragments. Ces substances peuvent être utilisées dans des traitements prophylactiques et thérapeutiques de la maladie, par exemple la SEP, en administrant des quantités effectives. Les substances peuvent être de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines 30 identifiées dans cette invention, des lipides, des glycolipides, des composés

chimiques, etc... Les petites molécules peuvent être ciblées et identifiées en grande quantité en utilisant des librairies combinatoires chimiques. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant ces substances en association avec des véhicules et/ou 5 adjuvants et/ou excipients et/ou diluants physiologiques acceptables, et des méthodes pour la préparation de médicaments à utiliser en thérapie ou en prévention de maladies auto-immunes dont la SEP en utilisant ces substances.

Pour identifier de telles molécules, on utilise les tests et 10 protocoles *in vitro* et *in vivo* comme décrit ci-dessus, en utilisant des échantillons prélevés de patient et/ou d'animaux non traités ou traités. Les molécules sélectionnées sont testées à différentes concentrations. Ces inhibiteurs sont aussi testés dans des essais de toxicité et 15 pharmacocinétique pour savoir s'ils peuvent représenter des drogues candidates valables. Les petites molécules peuvent être ciblées et identifiées en grande quantité en utilisant des librairies combinatoires chimiques.

La présente invention concerne aussi l'utilisation de cellules transformées *in vivo* après injection de vecteurs contenant au moins un 20 gène d'intérêt thérapeutique défini à partir des molécules d'intérêt identifiées ou leurs fragments pour la préparation d'une composition prophylactique et/ou thérapeutique dite de thérapie génique et ladite 25 composition. Il est rappelé que pour la simplicité de l'exposé, on parlera généralement de molécules d'intérêt de l'invention pour désigner le ou les différents V β associé(s) à l'activité superantigénique et la ou les protéines de MSRV-1, en particulier la protéine env de MSRV-1.

La composition comprend au moins un vecteur contenant un 30 gène thérapeutique comme décrit ci-dessous, capable d'être introduit dans une cellule cible *in vivo* et d'exprimer le gène d'intérêt thérapeutique *in vivo*. L'avantage repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un

niveau basal de molécules exprimées chez le patient traité. Des vecteurs ou acides nucléiques codant pour des gènes d'intérêt thérapeutique sont injectés. Ces vecteurs et acides nucléiques doivent être transportés jusqu'aux cellules cibles et transfacter ces cellules dans lesquelles ils 5 doivent être exprimés *in vivo*.

L'invention concerne l'expression *in vivo* de séquences nucléotidiques et/ou de vecteurs tels que décrit précédemment, c'est-à-dire des séquences correspondant à des gènes d'intérêt thérapeutique codant notamment :

10 - soit au moins pour une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, et/ou

- soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt identifiées dans la présente invention et leurs fragments. Il peut s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule 15 effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T " helper " inhiber l'activité d'au moins une molécule d'intérêt de l'invention. Il peut s'agir de fragments d'anticorps exprimés par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation sanguine d mammifère ou patient porteur des cellules 20 génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps, et/ou

25 - soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine choisie parmi les molécules identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, et/ou

soit au moins pour un ligand ou toute partie du ligand capable de se fixer sur au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt 30 identifiées dans la présente invention ou leurs fragments, et/ou d'inhiber sa

fonction. A partir des séquences en acides aminés des molécules d'intérêt de l'invention ou de leurs fragments , il est à la portée de l'homme de l'art de déduire les séquences nucléotidiques ADN et ARN correspondantes aux molécules d'intérêt ou à leurs fragments en se servant du code génétique 5 et en tenant compte de sa dégénérescence. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de ces séquences nucléotidiques sous forme de séquences anti-sens, de séquences codant pour un gène thérapeutique, de séquences pouvant être contenues dans un vecteur pour la réalisation de transformation cellulaire *ex vitro* et/ou *in vivo* (thérapie génique).

10 Selon un mode de réalisation particulier, il s'agit d'utiliser la thérapie génique de manière à diriger la réponse immune contre la protéine, le peptide ou la molécule d'intérêt cible, c'est-à-dire contre toute molécule choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments, et/ou contre toute molécule inhibitrice de l'activité et/ou de l'expression 15 et/ou du métabolisme desdites molécules d'intérêt, et/ou des ligands desdites molécules. Pour cela il est évident que les cellules à cibler pour la transformation avec un vecteur sont des cellules appartenant au système immun, soit des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, macrophages, ...), soit des cellules de type lymphocytes (CD4/CD8).

20 Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène (APC). Les APCs comme les macrophages, les cellules dendritiques, les microgliocytes, les astrocytes jouent un rôle dans l'initiation de la réponse immune. Elles sont les premiers composants cellulaires qui capturent 25 l'antigène, l'apprête dans la cellule et expriment des molécules du CMHI et CMHII transmembranaires impliquées dans la présentation de l'immunogène aux cellules T CD4 + et CD8 +, elles produisent des protéines accessoires spécifiques qui participent à l'activation des cellules T via la reconnaissance des déterminants V β du récepteur T à la surface des lymphocytes T 30 (Debrick et al ;, 1991, J. Immunol 147 : 2846 ; Reis et al., 1993, J Ep

Med 178 : 509 ; Kovacsics-bankowski et al., 1993, PNAS 90 : 4942; Kovacsics-bankowski et al., 1995 Science 267 : 243 ; Svensson et al., 1997, J Immunol 158 : 4229 ; Norbury et al ;, 1997, Eur J Immunol 27 : 280). Pour une vaccination, il peut être avantageux de disposer d'un système de thérapie génique qui peut cibler le transfert de gène dans de telles cellules APC.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules APCs *in vivo* tout ou partie d'un anticorps et/ou d'un ligand, capable de réagir avec la protéine ou le peptide cible choisis parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments. De telles cellules vont alors spécifiquement phagocytter ladite protéine ou ledit peptide, l'apprêter de façon à ce que des fragments de ce peptide soient présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène.

La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour des anticorps capables de réagir avec des polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps. Citons par exemple les gènes codant pour les chaînes légères et lourde de l'anticorps YTH 12.5 (anti-CD3) (Routledge et al. 1991, Eur J Immunol 21 : 2717-2725), de l'anti-CD3 selon Arakawa et al ; 1996, J. Biochem. 120 : 657-662. Les séquences d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier. Il est également possible à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en œuvre des banques de cDNA (Maniatis et al ., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la

séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire (Polydefkis et al., 1990 J Exp Med 171 : 875-887). Ces techniques de biologie moléculaire 5 ont été parfaitement bien décrites.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules APCs *in vivo* des fragments immunogènes correspondant à au moins une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et/ou leurs fragments. Pour cela, on peut choisir de faire exprimer par le vecteur soit le polypeptide 10 complet soit de manière préférée des polypeptides sélectionnés pour réagir avec des ligands et/ou récepteurs spécifiques. Le peptide immunogène codé par le polynucléotide introduit dans la cellule du vertébré *in vivo* peut être produit et/ou sécrété, apprêté puis présenté à une cellule présentatrice de l'antigène (APC) dans le contexte des molécules du CMH. Les APC ainsi 15 transférées *in vivo* induisent une réponse immune dirigée contre l'immunogène exprimé *in vivo*. Les APC possèdent différents mécanismes pour capturer les antigènes : (a) la capture des antigènes par des récepteurs membranaires comme les récepteurs aux immunoglobulines (Fc) ou pour le complément disponibles à la surface des granulocytes, des 20 monocytes ou macrophages permettant une délivrance efficace de l'antigène dans les compartiments intracellulaires après phagocytose médiée par les récepteurs. (b) l'entrée dans les APC par pinocytose en phase fluide, impliquant différents mécanismes : la micropinocytose c'est-à-dire la capture de petites vésicules ($0.1\mu\text{m}$) par les puits recouverts de clathrine et la macropinocytose c'est-à-dire la capture de plus grosses vésicules (avec une taille variant entre $0.5\mu\text{m}$ et environ $6\mu\text{m}$) (Sallusto et al. 1995, J Exp Med 182 : 389-400). Tandis que la micropinocytose existe de façon constitutive dans toutes les cellules, la macropinocytose est limitée à des types cellulaires, comme par exemple les macrophages, les 25 cellules dendritiques, les astrocytes, les cellules épithéliales stimulées par 30

des facteurs de croissance (Racoosin et al., J Cell Sci 1992, 102 : 867-880). Dans cette invention, on entend par cellules capables de macropinocytose, les cellules qui peuvent réaliser les événements décrits ci-dessus et les cellules qui peuvent capturer des macromolécules de préférence entre 0.5 µm et environ 6 µm dans le cytoplasme.

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T "helper" de façon à ce qu'elles expriment à leur surface des ligands d'au moins une desdites molécules d'intérêt de l'invention, naturellement non exprimés par ces cellules, et capables de se fixer à tout ou partie d'au moins une des molécules d'intérêt de l'invention à la surface de la même cellule ou d'une autre cellule et d'inhiber l'activité d'au moins une molécule d'intérêt de l'invention, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide. Conformément à la présente invention, il est également possible de sélectionner une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps dirigé contre une protéine choisie parmi les molécules d'intérêt de l'invention et les séquences peptidiques et/ou les fragments desdites séquences, susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide par ces cellules effect des molécules d'intérêt de l'invention présentes à la surface des lymphocytes cytotoxiques et/ou lymphocytes T "helper", voire d'inhiber l'activité de ces molécules d'intérêt.

De nombreux outils ont été développés pour introduire différents gènes hétérologues et/ou vecteurs dans des cellules, en particulier des cellules de mammifères. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : la première catégorie implique des techniques physiques comme la micro-injection, l'électroporation ou le bombardement de particules. La seconde catégorie est basée sur l'utilisation de techniques en biologie

moléculaire et cellulaire avec lesquelles le gène est transféré avec un vecteur biologique ou synthétique qui facilite l'introduction du matériel dans la cellule *in vivo*. Aujourd'hui, les vecteurs les plus efficaces sont les vecteurs viraux en particulier les adénoviraux et rétroviraux. Ces virus possèdent des propriétés naturelles pour traverser les membranes plasmiques, éviter la dégradation de leur matériel génétique et introduire leur génome dans le noyau de la cellule. Ces virus ont été largement étudiés et certains sont déjà utilisés expérimentalement dans des applications humaines en vaccination, en immunothérapie, ou pour compenser des déficiences génétiques. Cependant cette approche virale a des limitations notamment due à la capacité de clonage restreinte dans ces génomes viraux, le risque de disséminer les particules virales produites dans l'organisme et l'environnement, le risque de mutagénèse artéfactuelle par insertion dans la cellule hôte, dans le cas des rétrovirus, et la possibilité d'induire une forte réponse immune inflammatoire *in vivo* pendant le traitement, ce qui limite le nombre d'injections possibles (Mc Coy et al. 1995, *human Gene Therapy* 6 : 1553-1560 ; Yang et al., 1996 *Immunity* 1 : 433-422). D'autres systèmes alternatifs à ces vecteurs viraux existent. L'utilisation de méthodes non virales comme par exemple la co-précipitation avec le phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs qui miment les systèmes viraux (pour un résumé voir Cotten et Wagner 1993, *Current Opinion in Biotechnology*, 4 : 705-710), ou l'utilisation de polymères comme les polyamidoamines (haensler et Szoka 1993, *Bioconjugate Chem* 4 : 372-379). D'autres techniques non virales sont basées sur l'utilisation de liposomes dont l'efficacité pour l'introduction de macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN des protéines ou des substances pharmaceutiques actives a été largement décrite dans la littérature scientifique. Dans ce domaine des équipes ont proposé l'utilisation de lipides cationiques ayant une forte affinité pour les membranes cellulaires et/ou les acides nucléiques. En fait il a été montré qu'une molécule d'acide

nucléique elle-même pouvait traverser la membrane plasmique de certaines cellules *in vivo* (WO 90/11092), l'efficacité étant dépendante en particulier de la nature polyanionique de l'acide nucléique. Dès 1989 (Felgner et al ;, Nature 337 : 387-388) les lipides cationiques ont été proposés pour faciliter l'introduction de larges molécules anioniques, ce qui neutralise les charges négatives de ces molécules et favorise leur introduction dans les cellules. Différentes équipes ont développés de tels lipides cationiques : le DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS 84 : 7413-7417), leDOGS ou Transfectam™ (Behr et al., 1989, PNAS 86 : 6982-6986), le DMRIE et le DORIE (Felgner et al., 1993 methods 5 : 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang 1991, BBRC 179 : 280-285), le DOTAP™ (McLachlan et al., 1995, Gene therapy 2 : 674-622) ou la Lipofectamine™, et les autres molécules décrites dans les brevets WO9116024, WO9514651, WO9405624. D'autre groupes ont développés des polymères cationiques qui facilitent le transfert de macromolécules en particulier des macromolécules anioniques dans les cellules. Le brevet WO95/24221 décrit l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO96/02655 décrit l'utilisation du polyéthylèneimine ou polypropylèneimine et les document US-A-5595897 et FR 2719316, l'utilisation des conjugués polylysine.

Etant donné que l'on souhaite obtenir *in vivo* une transformation ciblée vers un type cellulaire donné, il est évident que le vecteur utilisé doit pouvoir être lui-même " ciblé " (comme décrit ci dessus).

Le matériel biologique défini dans la présente invention peut être administré *in vivo* notamment sous forme injectable. On peut également envisager une injection par voie épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration

et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, du stade et/ou de l'évolution de la maladie, ou encore de l'acide nucléique et/ou de la protéine et/ou peptide et/ou molécule et/ou cellule à transférer ou de 5 l'organe/tissus cible.

D'autres objets de l'invention sont les suivants :

- un procédé pour identifier des substances capable de bloquer la transcription et/ou la traduction d'un rétrovirus humain, en particulier un rétrovirus endogène, tel que défini précédemment, et présentant une 10 activité superantigénique, ladite activité superantigénique étant associée à une maladie auto-immune selon lequel,

on met en contact la substance avec des cellules exprimant un polypeptide rétroviral tel que défini précédemment et ayant une activité superantigénique, et

15 on détecte une perte ou diminution de l'activité superantigénique selon l'invention.

- un kit pour le criblage de substances capables de bloquer l'activité superantigénique d'un rétrovirus, en particulier un rétrovirus humain endogène, associée à une maladie auto-immune, ou capable de 20 bloquer la transcription et/ou la traduction dudit rétrovirus, comprenant :

des cellules exprimant à leur surface des produits du MHC de classe II, transformées avec et exprimant fonctionnellement un superantigène rétroviral,

25 des cellules porteuses de chaînes du récepteur d'un V β ou de V β s stimulées par le superantigène rétroviral, et

des moyens pour détecter une perte ou diminution de l'activité superantigénique selon l'invention.

- l'utilisation de substances capables d'inhiber une fonction d'un rétrovirus humain, en particulier un rétrovirus endogène pour la préparation 30 d'un médicament pour une utilisation en thérapie et/ou prévention d'une

maladie auto-immune associée à un superantigène rétroviral, en particulier associée à la SE ; avantageusement les substances sont choisies parmi l'AZT et la DDI (didésoxyinosine).

5 - l'utilisation de substances capables d'inhiber la fonction de superantigène d'un rétrovirus humain, ne particulier un rétrovirus endogène, pour la préparation d'un médicament pour une utilisation dans la thérapie d'une maladie auto-immune associée au superantigène rétoviral, en particulier associée à la SEP.

10 Définitions :

Par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)2, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 ; Bird et al., 1988 Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif, et par dérivé on entend, par exemple, un dérivé chimérique d'un tel anticorps (voir par exemple les chimères des anticorps antiCD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996 J Biochem 120 : 657-662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al 1989, Nature 339 : 394-397).

Par anticorps transmembranaire on entend un anticorps dont au moins la région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son 20 antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'amino acides (polypeptide transmembranaire) permettant 25 l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée avec la

séquence d'acide nucléique codant pour undit polypeptide transmembranaire.

Par éléments assurant l'expression d'un gène *in vivo*, on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Par cellules effectrices cytotoxiques, on entend les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) qui expriment à leur surface les molécules CD8, et les cellules tueuses (NK) ainsi que leurs dérivés telles que par exemple les LAK (Versteeg 1992 Immunology today 13 : 244-247 ;Brittende et al 1996, Cancer 77 :1226-1243). Par 'lymphocytes T helper' on entend désigner notamment les cellules exprimant à leur surface les molécules CD4 qui permettent après activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune. Les polypeptides et notamment les récepteurs exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du complexe TCR comprenant les déterminants Vb et/ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur J

Immunol 28 : 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, Gene therapy 5 : 31-39), telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple NKAR, Nkp46, ... ; 5 (Kawano et al., 1998 Immunology 95 :5690-5693 ; Pessino et al., 1998 J Exp Med188 :953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le récepteur Fc (Deo et al., 1997, Immunology Today 18 : 127-135).

Par efficacité thérapeutique de manière générale, on entend 10 l'effet inhibiteur de l'activité de type superantigénique telle que définie par les profils V β s de l'invention et la capacité d'inhiber et/ou de bloquer les interactions moléculaires et/ou immunologiques des V β s de l'invention conduisant à leur expansion ou diminution telle que décrite précédemment.

Par surnageant ou fraction de surnageant on entend le 15 surnageant ou une fraction de ce dernier jusqu'aux molécules, peptides et/ou protéines qu'ils comprennent.

Les expériences ont été réalisées à partir :

1) de cellules mononucléées sanguines provenant de onze 20 donneurs sains et purifiées sur un gradient de Ficoll. Le typage HLA DR de chaque donneur a été effectué au préalable.

2) (i) d'un pool de surnageants de culture concentré par ultracentrifugation (100 000g x 2 heures) de lymphocytes B humains provenant de patients SEP (LBSEP) ou de témoins non-SEP (LBTE), et (ii) de 25 surnageant de culture de cellules de plexus choroïdes humains provenant d'un patient SEP (GRE) et d'un témoin non-SEP (LES).

3) de protéines recombinantes.

Exemple 1 : Préparation d'extraits de surnageants de culture de 30 cellules provenant de patients atteints de SEP ou de témoins non SEP.

Les protocoles de culture des cellules de plexus choroïdes ont été décrits dans la demande de brevet PCT WO 93/20188.

1) Culture des cellules de plexus choroïdes.

Les cellules de plexus choroïdes sont obtenues à partir 5 d'explants prélevés post-mortem et mis en culture, éventuellement après dissociation mécanique et/ou enzymatique des tissus prélevés. Les cellules qui prolifèrent dans la culture sont d'allure fibroblastique et correspondent à des cellules d'origine leptoméningées, parfois appelées "fibroblastes de plexus choroïdes". Elles peuvent être cultivées pendant un certain nombre 10 de passages et être congelées lors de passages intermédiaires et décongelées ultérieurement pour une nouvelle culture.

Les cellules LES (témoin non-SEP) et GRE (SEP) ont été décongelées puis remises en culture dans du milieu F-12 "complet" contenant :

15 pénicilline 200 U/ml
 streptomycine 20 mg/l
 L-glutamine 6 mM
 pyruvate de sodium 1%
 acides aminés essentiels 1%.
20 anticorps anti-IFN leucocytaire (anti-interféron alpha polyclonal commercialisé par Sigma) ajouté à 10 U/ml final.

Ce milieu est supplémenté de 30% de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté à 56°C pendant 30 min La culture cellulaire se fait dans une étuve à 37°C humidifiée, en présence de 5% de CO₂. Le 25 changement du milieu s'effectue deux fois par semaine. Si les cellules adhérentes sont à confluence dans le fond du flacon, la culture est dédoublée. Pour ce faire, le surnageant de culture (SC) est éliminé et remplacé par du milieu F12 complet-SVF 30% "frais". A l'aide d'un grattoir, ou d'un mélange trypsine-EDTA, les cellules sont décollées de la 30 paroi du flacon. Puis, elles sont resuspendues soigneusement avant d'être

partagées dans deux flacons de culture. On dit que la culture est dédoublée ou qu'elle a subi un passage.

Les SC sont recueillis et congelés à -80°C pour l'ultracentrifugation, après élimination des débris cellulaires par centrifugation à 3000 tours/min pendant 30 min. Pour l'étude, un volume total de 400 ml environ a été décongelé, regroupé et homogénéisé avant ultracentrifugation, pour chaque culture (SEP/GRE et NON-SEP/LES).

2) Culture des lignées B lymphoblastoïdes.

- Obtention de lymphocytes B à partir du sang périphérique et établissement de lignées B lymphoblastoïdes immortalisées par l'EBV (Virus d'Epstein Barr).

Les lymphocytes humains sont isolés à partir de 50 ml de sang hépariné dilué au demi avec du RPMI 1640 par centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ils sont délicatement recueillis de l'anneau ainsi que des éventuels agrégats cellulaires pouvant flotter juste au dessous de l'anneau. Les cellules sont alors lavées deux fois dans du milieu RPMI 1640. Après ces lavages, les cellules sont resuspendues à la concentration de 2x10⁶ cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 contenant :

pénicilline 200 U/ml
20 streptomycine 20 mg/l
L-glutamine 6 mM
pyruvate de sodium 1%
acides aminés essentiels 1%.
anticorps anti-IFN leucocytaire (anti-interféron alpha
25 polyclonal-Sigma) ajouté à 10 U/ml final.

Ce milieu est supplémenté de 20% de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté à 56°C pendant 30 min.

Les flacons de culture sont incubés dans des étuves à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ après avoir ajouté 30 au milieu de culture, 1 ml de surnageant filtré de culture productive EBV

B95-8 (soit 10^5 particules virales EBV pour 4 à 5×10^6 lymphocytes totaux) en présence de 200 µl d'une solution de CSA-Sandoz (2 µg de CSA pour 4 à 5×10^6 lymphocytes totaux) et ceci, jusqu'au premier changement de milieu de culture. Le changement du milieu de culture s'effectue deux fois par semaine. Les flacons sont entretenus pendant trois mois, au delà desquels, si aucune prolifération lymphocytaire n'a débuté, le flacon est jeté. Lorsque la prolifération cellulaire a commencé dans un flacon, les cellules sont conservées dans le même flacon jusqu'à ce qu'un nombre significatif de colonies prolifératives forment des amas. Le "dédoublement" de la culture (passage ou repiquage) s'effectue après dissociation mécanique des amas par pipetage et refoulement vigoureux. Les cultures ainsi obtenues correspondent à des lignées de lymphocytes B (lignées Lymphoblastoïdes). Quatre lignées provenant de SEP certaines et deux lignées provenant de témoins non-SEP ont été obtenues dans ces conditions.

- Congélation des cellules.

Les cellules sont lavées dans du milieu RPMI-SVF 20%. Le culot repris dans du SVF (1 ml environ pour 8×10^6 cellules) est transféré dans un cryotube pour la congélation. 200 µl d'une solution de SVF DMSO préparée à l'avance et conservée à -20°C sont ajoutés à la suspension cellulaire (concentration finale de DMSO = 10%) qui est alors légèrement vortexée. Les cellules sont ainsi congelées à -80°C dans du coton cardé, puis stockées le lendemain dans l'azote.

- Décongélation et remise en culture des cellules congelées dans du DMSO.

Les cellules décongelées à température ambiante sont lavées deux fois dans 10 ml de milieu RPMI-SVF 20% avant la remise en culture.

Les quatre cultures SEP et les deux cultures témoins sont remises en culture en même temps, avec les mêmes réactifs et les mêmes lots de milieux, mais cultivées dans des laboratoires de culture séparés (P3

et P2 respectivement). Les cultures individuelles ont été menées en parallèle pendant environ un mois, afin de recueillir un volume, après pool des SC séparés de chaque patient SEP et de chaque témoin, d'environ 600-800 ml de chaque type (LBSEP et LBTE). Ce volume a été réuni par 5 congélation systématique à - 80°C des surnageants prélevés deux fois par semaine après une pré-centrifugation à 1800 tours/min pendant 10 min. pour sédimenter et récupérer les cellules en suspension, suivie d'une deuxième pré-centrifugation à 3000 tours/min pendant 30 min. pour éliminer les débris cellulaires.

10 Les surnageants SEP et non-SEP ont été décongelés et regroupés séparément et mélangés (SEP = pool LBSEP et témoin = pool LBTE) avant ultracentrifugation (pools de 650 ml). Les culots d'ultracentrifugation d'un même pool centrifugé après répartition dans des tubes séparés de 40 ml, ont aussi été regroupés et mélangés avant 15 aliquotage et congélation de l'extrait à tester, afin d'obtenir un extrait homogène sur tous les aliquotes d'une même origine.

3) Détection des mycoplasmes pouvant contaminer la culture.

Un kit (Boehringer) basé sur la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a été utilisé pour la détection de mycoplasmes afin 20 de garantir l'absence de contamination mycoplasmique dans les cultures.

4) Obtention d'un concentrat de surnageant de culture par ultracentrifugation sur coussin de glycérol.

Les surnageants décongelés et préalablement débarrassés des débris cellulaires sont transférés dans des tubes pour ultracentrifugation. 25 Un coussin de glycérol (PBS - glycérol 30%) de quelques cm est alors déposé dans le fond du tube. Après deux heures d'ultracentrifugation à 100 000 x g (calculé au milieu du tube) à 4°C et décélération lente (30 min.), le surnageant est éliminé, le culot repris dans du tampon PBS avec 10% de glycérol, regroupé et homogénéisé avec les culots des autres 30 tubes du même pool d'origine et le tout est aliquoté sous 100 µl. Un aliquot

sert pour le dosage d'activité transcriptase inverse (RT) et les autres sont conservés à -80°C. Les aliquots nécessaires sont décongelés pour les tests sur cellules mononucléées sanguines.

5 **Exemple 2 : Préparation de cellules mononucléées sanguines provenant de onze donneurs sains dont le typage HLA DR a été établi.**

	Donneurs	Typage HLA DR
	1-	DR2-DR4
	2-	DR1-DR1 → DR1
10	3-	DR3-DR11 (5)
	4-	DR13-DR8
	5-	DR13(6)-DR14 → DR6
	6-	DR2-DR2 → DR2
	7-	DR3-DR12(5)
15	8-	DR3-DR7
	9-	DR3-DR13
	10-	DR4-DR5
	11-	DR4-DR4 → DR4

Les cellules mononucléées sanguines de 100 ml de sang,
20 provenant des onze donneurs précités, sont séparées des hématies sur gradient de Ficoll (15 ml de Ficoll/25 ml de sang) par centrifugation 15 min. à 800 g. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu RPMI 1640 et recentrifugées dans les mêmes conditions avant d'être aliquotées et congelées dans l'azote gazeux à la concentration finale de 2×10^7 cellules/ml dans une solution de 90% de sérum humain décomplémenté et 10% de DMSO

Exemple 3 : Mise en culture de cellules mononucléées sanguines de donneurs sains.

Après décongélation rapide, les lymphocytes de donneurs sains (5×10^6 cellules) sont mis en contact 30 min. à 37°C avec 100 µl de surnageants de culture concentrés (i) de LBSEP ou de LBTE ou (ii) de GRE ou de LES.

5 Après mise en contact, les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture (RPMI supplémenté de 10% de sérum humain AB décomplémenté et de gentamycine) et distribuées dans des cupules de plaques de culture à 24 trous à raison de 2×10^6 cellules par ml. La viabilité des cellules et leur immunocompétence ont été vérifiées en
10 introduisant en contrôle une activation par un mitogène classique (PHA à 5 µg / 2×10^6 cellules).

Exemple 4 : Analyse du répertoire V β des lymphocytes CD3 par immuno-détection.

15 L'analyse du répertoire des CD3 a été réalisée en utilisant un anticorps anti-CD3 couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine et 12 anticorps anti-V β couplés à la biotine (Immunotech-Coulter-Beckman). Ces douze anticorps sont répertoriés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Ac anti-V β	Référence	Cible Sag	Commentaires
V β 2	IM 2081	TSST-1	10% de CD3 + PBL
V β 3	IM 2109	SEB	
V β 5-1	IM 2082		4-7% de CD3 + PBL
V β 7	IM 2288		1.5-2.4 % de CD3 + PBL Superantigène diabète IDDM (Conrad et al., J Immunol, 1997)
V β 8	IM 1191	SEE, N protéine rage	2.6-5.1% de CD3 + PBL Superantigène rage (Lafon et al., Nature 1992)
V β 12	IM 2019	SEB (12a)	1.1-1.9% de CD3 + PBL
V β 13-1	IM 2021	EBV	1.8-3.3% de CD3 + PBL Superantigène Epstein Barr (Sutkowski et al., J. Exp. Med. 1996)

V β 14	IM 2022		2.2-5.6% de CD3 + PBL
V β 16	IM 2023		1.1- 2 % de CD3 + PBL
V β 17	IM 1194	MAM, SEB	3.3-7% de CD3 + PBL
V β 21-3	IM 2025		2.2-3.6 % de CD3 + PBL
V β 22	IM 2026		2.4-5.1 % de CD3 + PBL

Après 24 heures de culture, le contenu des cupules a été cultivé respectivement en présence de LBSEP, LBTE et PHA, ou GRE, LES, et PHA est récolté. Le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C pour la détection ultérieure de cytokines. Les cellules sont lavées dans du tampon phosphate, réparties dans des microtubes et incubées avec un anticorps anti-CD3 marqué à l'isothiocyanate de fluoroscéine (0,5 µg pour 5×10^5 cellules) et avec chaque anticorps anti-V β biotinylé (1 µg d'anticorps pour 2×10^6 cellules), pendant 30 min à 4°C simultanément. Les cellules sont ensuite lavées dans du tampon phosphate et incubées 30 min à 4°C avec de la streptavidine couplée à la phycoérythrine (1 µl dans 50 µl de suspension cellulaire). A l'issue de ce temps d'incubation, les cellules sont lavées et resuspendues dans 250 µl de Cell Fix (nom commercial) avant d'être analysées en cytofluorimétrie. L'immuno-fluorescence est mesurée à l'aide d'un cytofluorimètre FACSCALIBUR (nom commercial) équipé du logiciel CellQUEST II (nom commercial) (Becton-Dickinson).

Pour chaque culture et chaque anticorps, les pourcentages de cellules exprimant un V β particulier parmi les cellules CD3+ totales sont calculés. La taille des familles est comparée dans les cultures activées par LBSEP, LBTE, LES et GRE). Une augmentation de 31% d'une famille V β dans une culture LBSEP ou GRE par rapport aux témoins négatifs est considérée comme une augmentation significative.

Exemple 5 : Protocole d'analyse du répertoire V β des lymphocytes T par biologie moléculaire.

Des extraits de surnageant de culture de cellules provenant de patients atteints de SEP ou de témoins non SEP sont préparés comme décrit dans l'exemple 1, et des cellules PBL de donneurs sains sont préparées comme décrit dans l'exemple 2. Les deux préparations sont mises en culture comme décrit dans l'exemple 3 et les cellules T sont récupérées avec les PBL de la culture. L'analyse du répertoire V β du récepteur T présent à la surface de ces cellules est réalisé par biologie moléculaire comme décrit ci-dessous :

Les ARN totaux des cellules lymphoïdes récupérées sont extraits en utilisant des techniques conventionnelles d'extraction, bien connues de l'homme de l'art. Une transcription inverse est réalisée; des ADN complémentaires sont ainsi synthétisés (par exemple en utilisant le kit RT-Expand, Roche). Puis on réalise une amplification spécifique d'une famille de transcrits V β (TCRBV) en choisissant des primers spécifiques de la famille V β étudiée (par exemple en choisissant des primers décrits dans la littérature). (Lue C et al., Am J Clin Pathol 1999 111 : 683 ; Akatsuka Y et al., Tissue Antigens 1999 53 : 122 ; Ryan DK et al., Mol Pathol 1997 50 : 77 ; Lang R et al., J Immunol Methods 1997, 203 : 181 ; Dreitz MJ et al., Vet Immunol Immunopathol 1999 69 : 113 ; Mima T et al., Biochem Biophys Res Commun 1999 263 : 172 ; Aifantis I et al., Immunity 1998 9 : 649 ; Deng X et al., J Biol Chem 1998 273 : 23709 ; Lobashevsky A

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 27 JUN 2001
INTERNATIONAL
WIPO PCT

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B05B3352WO MD/DGR	POUR SUITE A DONNER		voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR00/00691	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20/03/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 19/03/1999	RECEIVED
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N33/569		JAN 07 2002	
Déposant BIO MERIEUX et al.		TECH CENTER 1600/2900	

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.

2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 25 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I Base du rapport
- II Priorité
- III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV Absence d'unité de l'invention
- V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI Certains documents cités
- VII Irrégularités dans la demande internationale
- VIII Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 04/10/2000	Date d'achèvement du présent rapport 25.06.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tél. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Fonctionnaire autorisé Van Bohemen, C N° de téléphone +31 70 340 2199



This Page Blank (uspto)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00691

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les éléments de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-95 version initiale

Revendications, N°:

1-77 reçue(s) le 23/03/2001 avec la lettre du 23/03/2001

Dessins, feuilles:

1/5-5/5 version initiale

2. En ce qui concerne la langue, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acide aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

This Page Blank (uspto)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00691

- de la description, pages :
- des revendications, n°s :
- des dessins, feuilles :

5. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- l'ensemble de la demande internationale.
- les revendications n°s 72.

parce que :

- la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
- la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire international significatif:

- le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.
- le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

This Page Blank (uspto)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00691

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-71 & 73-77
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-71 & 73-77
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-71 & 73-77
	Non : Revendications

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

This Page Blank (uspi).

Concernant le point III**Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La présente Administration considère que l'objet de revendication 72 est visé par les dispositions de la règle 67.1 () PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de ces revendications est susceptible d'application industrielle (article 34(4) a) i) PCT).

Concernant le point V**Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants; ces documents ont été cités dans le rapport de recherche international:

D1: H. Perron et al. (1998). Retrovirus, cytotoxic molecules including superantigen and multiple sclerosis: Epiphénomène ou nouvelle voie de recherche.

Journal of Neuroimmunology, Vol. 90, No. 1, pp. 68.

Meeting Info.: Fifth International Congress of the International Society of Neuroimmunology Montreal, Canada August 23-27, 1998.

D2: B.A. Torres et al. (1996). HIV encodes for its own CD4 T-cell superantigen mitogen. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 225, No. 2, pp. 672-678.

Les superantigènes sont des molécules susceptibles de se lier à des molécules de classe 11 du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et à des séquences peptidiques caractéristiques de certaines familles de récepteurs des cellules T (Va). Ces super antigènes activent un grand nombre de clones T, indépendamment du peptide antigénique reconnu par leur TCR (récepteur des cellules T) en association avec le CMH de la cellule présentatrice d'antigènes. Les superantigènes sont des produits d'expression de micro-organismes, tels que bactéries et rétrovirus exogènes

This Page Blank (uspto)

ou endogènes. La Demandante a maintenant montré que l'expression d'un superantigène ou d'une protéine ayant certains effets de type superantigène est associée à un état pathologique, par exemple un état associé à la sclérose en plaques. L'invention concerne notamment un procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique, comprenant la mise en évidence d'une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V-beta16 et/ou V-beta17 ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V-beta16 et un procédé de détection d'un état pathologique dans un échantillon biologique selon lequel on met en évidence au moins l'un de paramètres suivants: une activité superantigénique, une stimulation de la production de cytokines, telles que l'IL-6 et INF-gamma ou une induction d'apoptose.

Le document D1 (cf. D1, résumé), qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche décrit un rétrovirus humain, notamment MSRV-1, ayant une activité superantigénique et étant associé à une maladie auto-immune, notamment multiple scléroses. D1 ne suggère pas que l'activité superantigénique est directement induite par une protéine de MSRV-1.

Le document D2 (cf. D2, résumé), qui est aussi considéré comme étant l'état de la technique le plus proche, décrit une composition contenant un agent, notamment un anticorps, susceptible de bloquer l'interaction du superantigène, notamment Nef, aux cellules présentatrices d'antigène. D2 ne décrit pas une composition visant l'inhibition d'une activité superantigénique, qui se manifeste par une expansion ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V-beta16 et/ou V-beta17.

Les documents D1 et D2 sont considérés comme arrière-plan technologique général.

Par conséquent, les revendications 1-71 et 73-77 de la présente demande sont considérées comme nouvelles et inventives ex article 33(1)-(3) PCT; il y a aussi une possibilité d'application industrielle.

This Page Blank (uspto)

Concernant le point VII**Irrégularités dans la demande internationale**

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 et D2 et ne cite pas ces documents.

Concernant le point VIII**Observations relatives à la demande internationale**

1. Les revendications 1, 2 et 3 ne sont pas claires et ne satisfont pas aux conditions requises à l'article 6 PCT, dans la mesure où l'objet pour lequel une protection est demandée n'est pas clairement défini: le terme "une perte majoritaire" et le terme "une expansion majoritaire" n'est pas claire pour l'artisan.

2. Bien que les revendications 41-44. aient été rédigées sous forme de revendications indépendantes distinctes, il semble qu'elles aient le même objet et qu'elles ne diffèrent l'une de l'autre que par une variation dans la définition de l'objet pour lequel la protection est demandée et par les termes utilisés pour en définir les caractéristiques. Par conséquent ces revendications ne sont pas concises. De plus, prises dans leur ensemble, elles sont dénuées de clarté, car du fait de la pluralité des revendications indépendantes, il est difficile, voire impossible de déterminer l'objet pour lequel une protection est demandée, et la délimitation par un tiers de l'étendue de la protection demandée nécessite des efforts excessifs.

Par conséquent, les revendications 41-44 ne satisfont pas aux conditions requises à l'article 6 PCT.

3. Les revendications 53-71 ne sont pas claires et ne satisfont pas aux conditions requises à l'article 6 PCT, dans la mesure où l'objet pour lequel une protection est demandée n'est pas clairement défini. La définition fonctionnelle ci-après ne permet pas à l'homme du métier de déterminer quelles sont les caractéristiques techniques nécessaires des compositions des revendications 53-71: "un agent thérapeutiqueetc., telle que définie dans les revendications 1 à 6".

This Page Blank (uspto)



Centre for Applied Microbiology and Research

*This document certifies that Cell Culture
(Deposit ref 9072201) has been accepted
as a patent deposit, in accordance with
The Budapest Treaty of 1977,
with the European Collection of Animal Cell Cultures on*

2nd July, 1992


Dr. Alan Doyle,
Curator.

ANALYST
R.J.
M.R.L.
H.Y.C.
J.H.

This Page Blank (uspto)

EPO - DG,
27.03.2001
(67)

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17 ou une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et/ou V β 17.
- 10 2. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16.
- 15 3. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16.
- 20 4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et une co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement des V β s 3 et 12.
- 25 5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'on met en évidence une perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et d'une co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s choisis parmi au moins l'un quelconque des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence au moins l'un quelconque des V β s 7, 14 et 17 et avantageusement des V β s 7 et 17.

This Page Blank (uspto)

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon biologique provient d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, en particulier la sclérose en plaques.

5 7. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que :

10 (i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la sclérose en plaques, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

15 (ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et

20 (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules mononucléées sanguines de l'étape (ii).

25 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de sclérose en plaques (SEP) sont choisies parmi les monocytes et les lymphocytes B et les cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains sont choisies parmi les lymphocytes T.

30 9. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que :

 (i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de

This Page Blank (uspto)

patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

5 (ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, 10 sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

15

10. Procédé selon les revendications 7, 8 et 9, caractérisé en ce que ladite expansion et éventuellement co-expansion est mise en évidence par utilisation de ligands, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence des V β s 16, 3 et 20 12, et en ce que ladite perte et éventuellement co-diminution est mise en évidence par utilisation de ligands, chaque ligand étant spécifique d'un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, de préférence les V β s 16, 7, 14 et 17.

25

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ligand est un anticorps, de préférence un anticorps monoclonal ou un fragment d'anticorps.

30

12. Procédé selon la revendication 7, 8 et 9, caractérisé en ce que pour mettre en évidence ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution on réalise

This Page Blank (uspto)

(i) une extraction des ARN totaux des cellules mononucléées sanguines mises en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture SEP et en présence de surnageant ou d'une fraction de surnageant de culture témoin,

5 (ii) une transcription inverse desdits ARN,

(iii) une amplification spécifique de chaque famille de V β s à l'aide d'un couple d'amorces déterminé,

(iv) un marquage par tout marqueur approprié des produits d'amplification obtenus,

10 (v) une électrophorèse desdits produits d'amplification et analyse des profils d'électrophorèse obtenus, à l'aide d'un détecteur approprié.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont 15 choisies parmi les lymphocytes.

14. Procédé de détection d'un état pathologique ou d'une prédisposition à un état pathologique dans un échantillon biologique caractérisé en ce que l'on met en évidence au moins l'un des paramètres suivants :

une activité superantigénique, telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 13,

une stimulation de la production de cytokines, telles que l'interleukine-6 (IL-6) et interféron- γ (INF- γ)

25 une induction d'apoptose cellulaire.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on détecte au moins deux des paramètres en association.

This Page Blank (uspto)

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'on détecte une activité superantigénique et une induction d'apoptose ou une activité superantigénique et une stimulation de la production de cytokines.

5 17. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on détecte les trois paramètres en association.

10 18. Procédé selon la revendication 7, 8 et 9, caractérisé en ce que l'état pathologique est associé à une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

15 19. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'activité superantigénique est induite directement ou indirectement par un agent effecteur choisi parmi les protéines et/ou les microorganismes et/ou les agents pathogènes.

20 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi parmi les bactéries et les rétrovirus, de préférence les rétrovirus humains, et en particulier le rétrovirus est MSRV-1 (« Multiple sclerosis retrovirus 1 ») et en particulier l'agent pathogène est MSRV-2 (« Multiple sclerosis retrovirus 2 »).

25 21. Procédé selon les revendications 19 et 20, caractérisé en ce que l'activité superantigénique est induite par la protéine d'enveloppe de MSRV-1 référencée en SEQ ID NO :2 ou par un fragment de ladite protéine.

22. Procédé selon les revendications 19 et 20, caractérisé en ce que l'activité superantigénique est induite par le gène *env* de MSRV-1 référencée en SEQ ID NO :1 ou un fragment dudit gène.

This Page Blank (uspto)

23. Rétrovirus humain, en particulier rétrovirus endogène, ayant une activité superantigénique et étant associé à une maladie auto-immune, caractérisé en ce que le rétrovirus est MSRV-1 et en ce que l'activité superantigénique est induite par l'expression du gène *env* de MSRV-1 ou d'un fragment dudit gène, en particulier un fragment dudit gène codant pour au moins un cadre de lecture de la protéine *env* de MSRV-1 (SEQ ID NO :2).

5

24. Rétrovirus humain, en particulier rétrovirus endogène, ayant une activité superantigénique et étant associé à une maladie auto-immune, caractérisé en ce que le rétrovirus est MSRV-1 et en ce que l'activité superantigénique est induite par la protéine *env* de MSRV-1 ou par un fragment de ladite protéine, en particulier par un fragment correspondant à au moins un cadre de lecture de ladite protéine (SEQ ID NO :2).

10

15 25. Molécule d'acide nucléique comprenant au moins un fragment ou des fragments de l'ARN ou de l'ADN du gène *env* de MSRV-1, identifié par SEQ ID NO :1, ledit fragment ayant une longueur d'au moins 18 nucléotides et de préférence d'au moins 24 nucléotides.

20 26. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 25 comprenant au moins un fragment codant pour au moins un cadre de lecture et contenant éventuellement un codon stop.

25 27. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 26, codant pour une activité superantigénique.

30 28. Molécule polypeptidique, en particulier protéine ou fragment de protéine comprenant au moins un fragment ou des fragments de ladite protéine *env* de MSRV-1 identifiée par SEQ ID NO :2, ledit fragment ayant une longueur d'au moins 6 acides aminés et de préférence d'au moins 8 acides aminés.

This Page Blank (uspto)

29. Molécule polypeptique selon la revendication 28 comprenant au moins un cadre de lecture.

5 30. Molécule polypeptidique selon la revendication 29, ayant une activité superantigénique.

31. Vecteur comprenant des molécules d'acides nucléiques telles que définies dans les revendications 25 à 27.

10 32. Procédé de détection d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique de patients atteints de sclérose en plaques, caractérisé en ce que l'on met en évidence une expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 7 ou une perte majoritaire de lymphocytes 15 porteurs d'un déterminant V β 7.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que :
(i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées,
20 lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la sclérose en plaques, ou d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993, sous le 25 numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et
(ii) on met en contact ledit surnageant de culture ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et
(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules 30 mononucléées sanguines de l'étape (ii).

This Page Blank (uspto)

34. Procédé selon la revendication 33, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes et les cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains sont choisies parmi les lymphocytes T.

5
35. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que :
10 (i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,

15 (ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant des patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les cellules mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes et les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 et LM7PC déposée à l'ECACC le 8 janvier 1993,
20 sous le numéro 93010817, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et

(iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i).

25

36. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'on met en évidence l'activité superantigénique selon un protocole tel que décrit dans les revendications 10 à 12 en utilisant un ligand ou une amplification associée à une électrophorèse.

30

This Page Blank (uspto)

37. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que

- (i) on produit ou synthétise un polypeptide, en particulier une protéine recombinante, telle qu'identifiée en SEQ ID NO :2, ou un fragment 5 dudit polypeptide ou de ladite protéine,
- (ii) on met en contact ledit polypeptide ou ladite protéine avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains, et
- (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement une co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution des cellules 10 mononucléées sanguines de l'étape (ii).

38. Procédé de détection d'une activité superantigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que :

- (i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites 15 cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou de patients suspectés d'avoir un risque de développer une maladie auto-immune, en particulier la SEP, et d'individus sains,
- (ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines 20 provenant des patients ou d'individus sains avec un polypeptide ou une protéine recombinante, telle qu'identifiée en SEQ ID NO :2, ou un fragment dudit polypeptide ou de ladite protéine, et
- (iii) on détecte ladite expansion et éventuellement co-expansion ou ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules 25 mononucléées sanguines de l'étape (i).

39. Procédé selon la revendication 38, caractérisé en ce que on utilise un polypeptide, tel que défini dans les revendications 28 à 30.

This Page Blank (uspto)

40. Procédé selon la revendication 37 ou 38, caractérisé en ce que l'édit polypeptide est codé par un acide nucléique, tel que défini dans les revendications 26 à 27 ou un vecteur selon la revendication 31.

5 41. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

10 i) on prélève un surnageant de culture de cellules mononucléées sanguines ou de cellules de plexus choroïdes ou de cellules leptoméningées, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune, en particulier la SEP, ou de cellules d'une lignée cellulaire établie, telles que les cellules des lignées PLI-2 et LM7PC,

15 ii) on met en contact l'édit surnageant ou une partie du surnageant de culture avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses prédéterminées, et

20 iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

25

42. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

30 i) on produit ou synthétise un polypeptide, en particulier une protéine recombinante,

This Page Blank (uspto)

(ii) on met en contact ledit polypeptide ou protéine recombinante avec une série de cultures, de préférence au moins trois, de cellules mononucléées sanguines provenant de donneurs sains en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses prédéterminées, et

5 (iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 10 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

15 43. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

20 (i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la SEP et d'individus sains,

25 (ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant de patients ou d'individus sains avec des surnageants de culture ou une fraction de surnageant de culture de cellules choisies parmi les mononucléées sanguines, les cellules de plexus choroïdes, les cellules leptoméningées, les cellules issues de lignées cellulaires établies, telles que les cellules des lignées cellulaires PLI-2 et LM7PC, et

30 (iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14,

This Page Blank (uspto)

17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

5

44. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'un agent ou d'une composition pour inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que

(i) on prélève des cellules mononucléées sanguines, lesdites cellules provenant de patients atteints d'une maladie auto-immune ou suspectés d'avoir un risque de développer la maladie, en particulier la SEP et d'individus sains,

(ii) on met en contact lesdites cellules mononucléées sanguines provenant de patients ou d'individus sains avec un polypeptide ou une protéine recombinante, et

(iii) on détecte l'inhibition de ladite expansion et éventuellement co-expansion ou l'inhibition de ladite perte et éventuellement co-diminution à partir des cellules mononucléées sanguines de l'étape (i), en présence dudit agent ou de ladite composition à des doses déterminées, des lymphocytes porteurs d'au moins un déterminant choisi parmi les V β s 16, 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22, en particulier les V β s 16 et/ou 17, les V β s 16, 3 et 12 ou les V β s 16, 7, 14, et 17, en particulier les V β s 16, 7 et 17, par utilisation d'un ligand comme décrit dans les revendications 10 et 11 ou d'une amplification associée à une électrophorèse comme décrit dans la revendication 12.

25

45. Procédé selon l'une quelconque des revendications 41 à 44, caractérisé en ce que les cellules proviennent d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, en particulier de sclérose en plaques.

This Page Blank (uspto)

46. Procédé selon l'une quelconque des revendications 41 à 45, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

5

10 47. Procédé d'évaluation de l'efficacité prophylactique et/ou thérapeutique d'un agent ou d'une composition vis-à-vis d'un état pathologique, et/ou d'une prédisposition à un état pathologique, caractérisé en ce que l'on met en évidence une inhibition d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique comme décrit dans les revendications 41 à 46.

15 48. Procédé selon la revendication 47, caractérisé en ce que l'on met en évidence l'inhibition de la perte majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et de la co-diminution de lymphocytes porteurs de V β s 7 et 17.

20 49. Procédé selon la revendication 46, caractérisé en ce que l'on met en évidence l'inhibition de l'expansion majoritaire de lymphocytes porteurs d'un déterminant V β 16 et de la co-expansion de lymphocytes porteurs de V β s 3 et 12.

25 50. Procédé selon l'une des revendications de 48 et 49, caractérisé en ce que les cellules proviennent d'un patient atteint d'une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

51

51. Procédé selon les revendications 48 à 50, caractérisé en ce que les cellules mononucléées sanguines provenant de patients atteints de SEP sont choisies parmi les lymphocytes B et les monocytes.

30

52. Procédé d'évaluation de l'efficacité prophylactique et/ou thérapeutique d'un agent ou d'une composition vis-à-vis d'un état

This Page Blank (uspto)

pathologique, et/ou d'une prédisposition à un état pathologique, caractérisé en ce que l'on met en évidence une inhibition d'une activité superantigénique dans un échantillon biologique comme décrit dans les revendications 48 à 51.

5 53. Composition à usage thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend, entre autres, un agent thérapeutique capable d'inhiber une activité superantigénique dans un échantillon biologique, telle que définie dans les revendications 1 à 6, éventuellement en association avec un excipient et/ou un adjuvant et/ou un diluant pharmaceutiquement acceptables.

10 54. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique est un agent antiviral, plus particulièrement antirétrovirale, en particulier humain, de préférence anti-MSRV1 tel qu'un inhibiteur du cycle de réPLICATION et/ou de l'expression d'un rétrovirus, tel qu'un anticorps anti-protéine rétrovirale, en particulier anti-enveloppe, tel que des oligonucléotides anti-sens, plus particulièrement bloquant l'expression rétrovirale.

15 55. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique est choisi parmi une molécule naturelle et/ou une molécule recombinante, ou un fragment desdites molécules, dont la séquence protéique correspond à la séquence des molécules V β s16 et/ou 17, de préférence V β 16, éventuellement en association avec une ou des molécules 20 naturelles et/ou recombinantes ou un fragment desdites molécules dont la séquence protéique correspond à la séquence des molécules V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement des molécules V β s 3 et 12.

25 56. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique est choisi parmi une molécule naturelle et/ou une

This Page Blank (uspa)

molécule recombinante, ou un fragment desdites molécules, dont la séquence protéique correspond à la séquence de la molécule V β 16 et/ou 17, éventuellement en association avec une ou des molécules naturelles et/ou recombinantes ou un fragment desdites molécules dont la séquence protéique 5 correspond à la séquences des molécules V β s 7, 14 et 17 et préférentiellement des molécules V β s 7 et 17.

57. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique est choisi parmi les molécules naturelles, et/ou 10 recombinantes et/ou de synthèse ou un fragment desdites molécules qui codent pour les molécules telles que définies dans les revendications 53 à 56.

58. Composition selon la revendication 57, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi les gènes 15 thérapeutiques comprenant des molécules ADN et/ou ARN.

59. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi les oligonucléotides anti-sens et les 20 oligonucléotides anti-gènes.

60. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi au moins un ligand susceptible d'interagir avec 25 les V β s 16 et/ou 17, en particulier le V β 16, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 2, 3, 7, 8, 12, 14, 17 et 22 et préférentiellement les V β s 3 et 12.

This Page Blank (uspto)

61. Composition selon la revendication 60, caractérisée en ce que le ligand est susceptible d'interagir avec un rétrovirus, en particulier un rétrovirus humain, tel que MSRV-1, ses protéines et/ou ses acides nucléiques.

5 62. Composition selon la revendication 60, caractérisée en ce que le ligand est un agent antiviral, plus particulièrement antiviral, en particulier humain, de préférence anti-MSRV1 tel qu'un inhibiteur du cycle de réPLICATION et/ou de l'expression d'un rétrovirus, tel qu'un anticorps anti-protéine rétrovirale, en particulier anti-enveloppe, tel que des oligonucléotides anti-sens, plus particulièrement bloquant l'expression rétrovirale.

10 63. Composition selon la revendication 60, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-récepteurs des récepteurs des cellules T (TCRs) des différents V β s.

15 64. Composition selon la revendication 61, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps anti-MSRV-1, de préférence les anticorps monoclonaux.

20 65. Composition prophylactique et/ou thérapeutique selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent prophylactique et/ou thérapeutique est choisi parmi au moins un ligand susceptible d'interagir avec le V β 16 et/ou 17, éventuellement en association avec au moins un ligand susceptible d'interagir avec au moins un des V β s 7, 14 et 17 et 22 et préférentiellement les V β s 7 et 17.

25 66. Composition selon la revendication 60, caractérisée en ce que le ligand est susceptible d'interagir avec un rétrovirus, en particulier un rétrovirus humain, tel que MSRV-1, ses protéines et/ou ses acides nucléiques.

This Page Blank (uspto)

67. Composition selon la revendication 63 ou 65, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps, de préférence les anticorps monoclonaux et les anti-récepteurs des TCRs des différents V β s.

5

68. Composition selon la revendication 63 ou 64, caractérisée en ce que le ligand est choisi parmi les anticorps anti-MSRV-1, de préférence les anticorps monoclonaux.

10

69. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est un agent susceptible de bloquer l'interaction du superantigène aux cellules présentatrices d'antigène.

15

70. Composition thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins une molécule dont la séquence protéique correspond à la séquence codant pour les molécules telles que définies dans les revendications 1 à 5, 10, 20 à 31 et 53 à 59, en particulier une molécule ADN et/ou ARN.

20

71. Composition selon la revendication 53, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique et/ou prophylactique est choisi parmi au moins une cellule modifiée génétiquement *in vitro*, de préférence une cellule d'origine mammifère, par un agent thérapeutique qui consiste en au moins une molécule d'acide nucléique codant pour au moins un ligand tel que défini dans les revendications 60 à 69, en particulier une molécule ADN et/ou ARN.

30

72. Utilisation d'une composition telle que définie dans les revendications 53 à 71, pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une

This Page Blank (uspto)

pathologie, en particulier une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques.

73. Procédé pour identifier des substances capable de bloquer la transcription et/ou la traduction d'un rétrovirus humain, en particulier un rétrovirus endogène, tel que défini dans les revendications 23 et 24, et présentant une activité superantigénique, ladite activité superantigénique étant associée à une maladie auto-immune selon lequel,

on met en contact la substance avec des cellules exprimant un polypeptide rétroviral tel que défini dans les revendications 28 à 30 et ayant une activité superantigénique, et

on détecte une perte ou diminution de l'activité superantigénique comme décrit dans les revendications 1 à 6.

74. Kit pour le criblage de substances capables de bloquer l'activité superantigénique d'un rétrovirus, en particulier un rétrovirus humain endogène, associée à une maladie auto-immune, ou capable de bloquer la transcription et/ou la traduction dudit rétrovirus, comprenant :

des cellules exprimant à leur surface des produits du MHC de classe II, transformées avec et exprimant fonctionnellement un superantigène rétroviral,

des cellules porteuses de chaînes du récepteur d'un V β ou de V β s stimulées par le superantigène rétroviral, et

des moyens pour détecter une perte ou diminution de l'activité superantigénique comme décrit dans les revendications 1 à 6.

75. Utilisation de substances capables d'inhiber une fonction d'un rétrovirus humain, en particulier un rétrovirus endogène pour la préparation d'un médicament pour une utilisation en thérapie et/ou prévention d'une maladie auto-immune associée à un superantigène rétroviral, en particulier associée à la SEP.

This Page Blank (uspto)

76. Utilisation selon la revendication 75, dans laquelle la substance est le 3'-azido-3'désoxythymidine (AZT) ou la didésoxyinosine (DDI).

5

77. Utilisation de substances capables d'inhiber la fonction de superantigène d'un rétrovirus humain, en particulier un rétrovirus endogène, pour la préparation d'un médicament pour une utilisation dans la thérapie d'une maladie auto-immune associée au superantigène rétroviral, en
10 particulier associée à la SEP.

This Page Blank (uspto)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO Biomerieux SA
Chemin de L'orme
69280 Marcy L'etoile
France

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the
DEPOSITOR:

PLI-2

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY:

92072201

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

a scientific description
 a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,
which was received by it on 22.07.92 (date of the original deposit)¹

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International
Depository Authority on (date of the original deposit) and
a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Dr Alan Doyle
ECACC
PHLS CAMR
Address: Porton Down

Signature(s) of person(s) having the power
to represent the International Depository
Authority or of authorized official(s):


Date: 9th December, 1992

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

This Page Blank (uspto)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

[] TO

BioMerieux SA
Chemin de L'orme
69280 Marcy L'étoile
France

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified on the following page

[] NAME AND ADDRESS OF THE PARTY
TO WHOM THE VIABILITY STATEMENT
IS ISSUED []

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: BioMerieux SA Address: Chemin de L'orme 69280 Marcy L'étoile France	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: 92072201 Date of the deposit or of the transfer: 22nd July, 1992
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 22nd July, 1992 ² . On that date, the said microorganism was	
<input checked="" type="checkbox"/> ³ viable	
<input type="checkbox"/> ³ no longer viable	

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

This Page Blank (uspto)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

100

Bicheriaux SA
Chemin de L'Orme
69280 Marcy L'Etoile
France NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
ISSUED PURSUANT TO RULE 7.1 BY THE
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
IDENTIFIED AT THE BOTTOM OF THIS PAGE

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY:
LM/HC	93010817
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 02.01.93 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: Dr A Doyle EDACC PHLS CAMR Porton Down Address:	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): Date: 23 March 1993

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of International Depository authority was acquired.

This Page Blank (uspto,

ANNEXE 2

BP/A/II/12
page 24

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO

BioMerieux SA
Chemin de L'Orme
69280 Marcy L'Etoile
France

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified on the following page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY
TO WHOM THE VIABILITY STATEMENT
IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: BioMerieux SA Address: Chemin de L'Orme 69280 Marcy L'Etoile France	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: 93010817 Date of the deposit or of the transfer: 8 January 1993
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 8 January 1993. 2. On that date, the said microorganism was	
<input checked="" type="checkbox"/> 3. viable	
<input type="checkbox"/> 3. no longer viable	

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

This Page Blank (uspt)

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Dr. Alan Doyle, Curator, ECACC Address: PHLS Centre for Applied Microbiology & Research Porton Down, Salisbury, Wilts. SP4 0JG, U.K.	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Alan Doyle Date: 9th December, 1992
--	--

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

This Page Blank (uspto)